

**(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG**

**(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum**  
Internationales Büro



**(43) Internationales Veröffentlichungsdatum**  
27. November 2003 (27.11.2003)

**PCT**

**(10) Internationale Veröffentlichungsnummer**  
**WO 03/097869 A2**

**(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>:**

**C12Q 1/68**

**(81) Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

**(21) Internationales Aktenzeichen:**

PCT/DE03/01572

**(22) Internationales Anmeldedatum:**

16. Mai 2003 (16.05.2003)

**(84) Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**(25) Einreichungssprache:**

Deutsch

**(26) Veröffentlichungssprache:**

Deutsch

**(30) Angaben zur Priorität:**

102 22 632.6 17. Mai 2002 (17.05.2002) DE

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

**(71) Anmelder** (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **CON / CIPIO GMBH** [DE/DE]; KYSELHÄUSER STRASSE 77, 06526 Sangerhausen (DE).

**(72) Erfinder:** SÜSS, Karl-Heinz (verstorben).

**(74) Anwalt:** BAUMBACH, Fritz; Robert-Rössle-Strasse 10, 13125 Berlin (DE).



**A2**

**(54) Title:** MICROSATELLITE MARKERS FOR GENETIC ANALYSES AND THE DIFFERENTIATION OF ROSES

**WO 03/097869**

**(54) Bezeichnung:** MIKROSATELLITENMARKER FÜR GENETISCHE ANALYSEN UND ZUR UNTERSCHIEDUNG VON ROSEN

**(57) Abstract:** Microsatellites from plants of the rose family, including said isolated microsatellites, primers from flanking regions of the microsatellites, a method for the production of microsatellites and the use thereof in the genotyping of plants from the rose family.

**(57) Zusammenfassung:** Mikrosatelliten aus Pflanzen der Gattung Rosa, einschließlich den isolierten Mikrosatelliten, Primern aus flankierenden Regionen der Mikrosatelliten, ein Verfahren zur Herstellung der Mikrosatelliten und deren Verwendung zur Genotypisierung von Pflanzen der Gattung Rosa.

## **Mikrosatellitenmarker für genetische Analysen und zur Unterscheidung von Rosen**

Der Erfindung betrifft neuartige genetische Marker für genetische Analysen und zur

5 Unterscheidung von Rosen.

Mögliche Anwendungsbereiche sind marker-gestützte Selektion und Herkunfts- und Variationsanalysen in Pflanzenzüchtung, Gartenbau und Landwirtschaft.

### **Stand der Technik**

10

Rosa ist eine Gattung mit über 20 Arten allein in Deutschland, deren taxonomische Einteilung sich noch weitgehend in der Diskussion befindet (Haeupler H., Muer T., Bildatlas der Farn- und Blütenpflanzen Deutschlands). Die Gattung umfaßt Arten unterschiedlicher Ploidiestufen und unterschiedlichster geographischer Herkunft. Eine 15 Vielzahl von Wildrosenarten kommt auf allen Kontinenten der Nordhalbkugel vor. Zudem sind natürliche Hybriden von im selben Habitat vorkommenden Rosenarten häufig, wodurch die Definition klar differenzierter Arten zusätzlich erschwert wird.

20 Andererseits ist die leichte Kreuzbarkeit von verschiedenen Rosenarten die Grundlage der großen Vielfalt von durch Züchtung entstandenen Sorten. Diese Vielfalt umfaßt Sorten mit unterschiedlicher Blütenfarbe und -form, unterschiedlicher Blühdauer (jährlich nur einmal blühend oder remontierend), Pflanzengröße und Wuchsform (Strauch-, Hecken-, Beet-, Kletter-, Bodendeckerrosen usw.), Art der Belaubung und Bestachelung, Aussehen der Früchte (Hagebutten), Winterhärte, Krankheitsresistenz 25 und Ansprüchen an die Bodenqualität.

30 Für eine sichere Bestimmung von Arten und Sorten (die meist Ergebnisse komplexer Kreuzungen sind) ist in den meisten Fällen Blüte, Frucht, Bestachelung, Belaubung und Wuchsform mit einzubeziehen. Somit ist im Allgemeinen auch für den Fachmann kurzfristig lediglich eine Zuordnung zu einer Gruppe von Arten und Sorten möglich, nicht aber eine eindeutige Bestimmung.

## Aufgabe-Lösungszusammenhang

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, neue Mikrosatellitenmarker zur genetischen Analyse von Pflanzen der Gattung Rosa bereitzustellen.

5

Die Aufgabe der Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert.

## Wesen der Erfindung

10 Die erfindungsgemäßen Marker basieren auf der Amplifikation bestimmter hypervariable Genomabschnitte, den sogenannten Mikrosatelliten, mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR). Zur spezifischen Amplifikation werden für jeden Mikrosatelliten-Locus zwei Primer, jeweils links und rechts in den flankierenden Sequenzen benötigt. Diese Primer sind im Durchschnitt 23 +/- 5 Basen lang und durch  
15 ihre Sequenzen definiert. Ein Mikrosatellitenmarker ist im Prinzip eine sequence tagged site (STS), welche durch zwei spezifische Primer definiert ist. Diese Primer flankieren, jeweils links und rechts eine sogenannte Mikrosatellitensequenz. Eine Mikrosatellitensequenz ist definiert als tandemrepetitive Wiederholung einer Di-, Tri- oder Tetranukleotidsequenz, beispielsweise  $(GA)_n$ , wobei  $n \geq 8$  ist. Es treten auch  
20 zusammengesetzte Mikrosatellitensequenzen auf, beispielsweise  $(GT)_n(AT)_n$ , sowie imperfekte Sequenzen, bei welchen einzelne Basen mutiert sind, beispielsweise  $(GT)_nCA(AT)_n$ . Zwischen verschiedenen Linien und Sorten kommt es zu Variationen der Anzahl der Repeats an einem bestimmten Locus. Dies führt nach Amplifikation des Mikrosatelliten mittels der spezifischen Primer in den flankierenden Sequenzen zu  
25 PCR-Produkten verschiedener Länge und damit zu Polymorphismus. Diese Polymorphismen werden stabil vererbt und können daher als genetische Marker verwendet werden. In manchen Fällen treten auch Nullallele (kein sichtbares Fragment) auf, wenn Mutationen innerhalb der Bindungsstelle für die Primer vorhanden sind.

30 Über die biologische Funktion dieser der repetitiven Fraktion des Genoms zugeordneten Motive gibt es bisher keine gesicherten Erkenntnisse. Es wurde jedoch festgestellt, daß die Anzahl der Wiederholungen eines Mikrosatellitenmotivs zwischen nah verwandten Arten, Sorten und Linien variabler ist als der übrige (insbesondere codierende) Teil des

Genoms. So könnten z.B. drei Rosensorten einen Mikrosatelliten tragen, der in der Länge variiert (12, 14 und 17 Wiederholungen des Motivs GT), dessen flankierende Sequenzen aber in allen drei Sorten identisch sind. Somit kann durch PCR relativ leicht ein Längenunterschied nachgewiesen werden: ein Primerpaar bestehend aus je einem 5 Primer links und rechts von der Mikrosatellitensequenz wird zur Amplifikation eines DNA-Fragments aus jeder der drei Linien verwendet.

Diese Fragmente unterscheiden sich dann in ihrer Länge: das Produkt der zweiten Sorte ist um 4 bp grösser als das der ersten Sorte, das Produkt der dritten Sorte um 10 bp. Dieser Längenunterschied (Längenpolymorphismus) kann z.B. durch verschiedene 10 Techniken der hochauflösenden Elektrophorese (z.B. Kapillarelektrophorese) nachgewiesen werden. Damit sind diese drei Rosensorten eindeutig unterscheidbar, und zwar in jeder Entwicklungs- und Verarbeitungsstufe, aus der DNA gewonnen werden kann (Blatt, Blüte, Frucht, Same, Keimling, evtl. auch Rosenöl, Hagebuttenmarmelade, Tee, Trockensträuße usw.).

15 Die Auftrennung und Detektion der erhaltenen PCR-Produkte kann mit verschiedenen technischen Varianten durchgeführt werden. Für die Auftrennung der Fragmente können hochauflösende Agarosegele, native Polyacrylamidgele oder denaturierende Polyacrylamidgele (=Sequenziergele) verwendet werden. Die Auftrennung kann auch 20 auf massenspektrometrischem Wege durchgeführt werden. Die Detektion der Fragmente kann je nach Trennungssystem über Ethidiumbromidfärbung, Silberfärbung oder bei radioaktiver Markierung der PCR-Fragmente über Autoradiographie erfolgen. Eine weitere sehr effektive Variante der Auftrennung und Detektion besteht im Einsatz 25 eines automatischen Sequenziergerätes mit farbstoff- bzw. fluoreszenzmarkierten Primern. Hierzu ist erforderlich, einen Primer aus jedem Mikrosatelliten-Primerpaar farbstoff- bzw. fluoreszenzmarkiert zu synthetisieren. Aus der PCR-Amplifikation resultiert ein markiertes Produkt, welches von dem Sequenziergerät detektiert werden kann. Dabei werden für jede Probe farbstoff- bzw. fluoreszenzmarkierte 30 Größenstandards in derselben Spur mit aufgetrennt. Eine spezielle Software erlaubt es danach, die absolute Größe jedes aufgetrennten Fragmentes zu berechnen und somit auch Fragmente zwischen verschiedenen Gelläufen zu vergleichen. Mit dieser Methode können pro Tag mehrere hundert Proben weitgehend automatisch analysiert werden.

Untersucht man eine größere Zahl von Sorten, so geht diese Eindeutigkeit verloren: Bei 100 Sorten werden mehrere Sorten dieselbe PCR-Produktgröße zeigen und durch einen einzigen Mikrosatellitenmarker nicht voneinander unterscheidbar sein. Deshalb müssen mehrere Mikrosatellitenmarker, die unabhängig voneinander in ihrer Länge variieren, 5 parallel untersucht werden. Daraus ergibt sich für jede untersuchte Rosensorte eine eindeutige Kombination von Mikrosatelliten-Fragmentlängen, die als der „Fingerprint“ dieser Sorte bezeichnet werden kann.

Für Rose wird eine Anzahl von 25 Mikrosatellitenmarkern ausreichen, um über 90% der 10 im Handel befindlichen Sorten voneinander zu unterscheiden. Bei Weizen liegt die Zahl z.B. bei 21 Markern für eine Unterscheidung von 95% aller Sorten. Mit diesem Ansatz nicht unterscheidbar bleiben sogenannte „Sports“, also neue Rosensorten, die durch Spontanmutation aus einer bereits existierenden Sorte hervorgegangen sind und sich in nur einer Eigenschaft (z.B. Blütenfarbe oder Wuchsform) von dieser unterscheiden. Die 15 beiden Genome sind in diesem Fall, abgesehen von der Mutation, identisch und mit dem beschriebenen Markerset wahrscheinlich nicht zu differenzieren.

Erfindungsgemäß werden Mikrosatellitenmarker bereitgestellt, die folgende Primerpaare mit zugeordneten Mikrosatellitensequenzen bzw. eine Anzahl davon 20 enthalten und die Loci verschiedener Chromosomen des Genoms von Pflanzen der Gattung Rosa amplifizieren und daher zur Genmarkierung Verwendung finden.

Name	Motiv	Produkt	Tm	Primer F* 5'->3'	Tm	Primer R 5'->3'
		-gröÙe (bp) in "Licht- blick"				
RMS001	GT&GC	242	57.1	TICAAAATTGCTGCCCTTAG	44.8	TACCAGTTGAGTGAGAAATAGTT
RMS002	GA	138	36.5	ATAATTTCCTTTGGTA	36.6	GATTGTCTTCACTATTCA
RMS003	GA	151	52.9	TGGAAAGGGAAAGCAACA	53.0	AAGGTTAGGCAGAAGTGACAGACAT
RMS004	GT&AT	143	55.0	CAGGCCAAGGAAGAGGTAAAGTAA	55.7	CGTATGCGCGTGTAGGAAGGG
RMS005	GA	143	53.1	CTACCGGTGACCAAGTGACGA	51.9	ATTTGCCCTCTCCCTTTGT
RMS006	GT&GA	114	53.0	ACCGGTCTCATCTTCCATTTG	52.2	GTAAGGTGCGTCCGTCTGTCA
RMS007	GA	171	48.4	TCTTCCGACTCCGACAA	54.8	TATGCCATTCAGACTCTCCAAACAC
RMS008	GA	176	53.4	TCTCTGGACAAAAACAAACACT	61.9	CCATGAAGGGCGGAGAGGA
RMS009	CT&GT	145	47.3	ATGGCAAAAGATTCTCCTAC	46.5	ACTTGGTAATTTCGAGCATAAA
RMS010	GA	105	61.2	GTTGGGGAAATTGAAGCAGAGA	58.9	TCTTCTCTACAAACCCAAACCAAC
RMS011	GT	190	47.9	TAGAAACGACCAATAAAAGAGG	48.0	TAACGAAACATCATCAATAGCA
RMS012	GT	141	48.8	ATAGAAAAATAGAGGGGGTGTG	46.4	GATCGAAAAGTGGTCAAATA
RMS013	GA	208	57.8	GCCTTAGCCGGGTTTCAA	45.6	GATCAATAACCGAAACTAACAAAG
RMS014	GA	124	56.1	TATTCTTCTCCACCGACGAC	56.2	CCTCACTGCCAACCCAACTGT
RMS015	GA	185	46.5	TAATGTAGGCAGATAAAAGGAGT	52.1	GCAGCTGCACAAACAAAGGAA
RMS016	GA	121	55.1	GGCCTGGACCTTCTCATTTG	56.9	AACCGCTGCTGCTTCATTTT
RMS017	AT&GT	246	46.2	AGGTCCCCGTATTTCAGG	46.2	AGTTGGCTTATGGCTTTT

RMS018	GT	125	46.4	TTTGGGTGGTAAGTTT	48.0	TTGCCAATAAGGAAGACA
RMS019	GA	104	57.1	ACCGTTTCCATTACCCCTTCACC	57.1	CGTGGCCATGGATTTTGTGA
RMS020	GA	239	59.9	AGGCGCCCATGCAAATCAA	47.9	TTCTAACGCCAAACTATGTAAT
RMS021	GA	188	50.9	AATTCCCTCTTACCCAAACAC	55.2	CCGGGAAGTCCCTATG
RMS022	GA	170	51.3	AAGAAGATAAAATTAGGGGAAAAA	52.6	GGCGAACATATTGATTGGT
RMS023	GT	170	42.4	TTGCTATTACAGATGAA	51.3	TAAACAAATAAATGGGGAGTAAAT
RMS024	AT&GT	200	44.0	ACTACTGTAAAATATGAAAAATCC	50.5	GTAGTAGGGTTGCAAGAAAATAA
RMS025	AT / GT	167	33.4	TAATGTAAGCTAACTAATCT	47.1	TTTAAATTTCGGTTGGAGA
RMS026	GT	129	38.8	ATAGATATGTTGGGTTCAC	39.3	AATGTCAGGTTGTTACATATG
RMS027	AT&GT	189	47.7	ACCGTTGTGCTTATCAGGA	48.2	ATTGGTGGTGCCTTACATAC
RMS028	AT&GT	237	50.0	TAGGCAAGACCATGAAACCAG	49.9	TGTGCCTGTTGCTTGTGTA
RMS029	GA	201	56.8	GGATAAAACCAACGGGACAGACTC	58.3	TCCGACACCATCCCTCCATATAA
RMS030	GA	201	46.2	GATAAAATTCAAGGCGAGAG	50.9	AAAAGATGAACGACCCAAATAAT
RMS031	GA	202	40.5	TATATTAAGAACAAAGTGAGAAC	43.1	GTGGCTATCGAAAAACAA
RMS032	AT&GT	193	40.7	AGAAACCAAACCTTAGGCAT	44.1	AACCATCCATATTTCAGTCAC
RMS033	GA	203	60.0	CAAGAGATGTCGGAAAAGCAGGAAAG	59.9	TGCACACCCAAATTACAAACCACAA
				T		
RMS034	GA	136	55.6	GCTTCTCGGTCTCGTGCTCTC	55.2	CTCCCGCTCAAAATCAATAATCTC
RMS035	GA	229	58.3	CCTCCCTGGCAGGCCCTTTCATT	56.1	ATCGGCTATCCACATCGTCTACAC
RMS036	GA	235	56.4	CTCGGGGCCAAATAACAAT	55.9	TTGCCCTACATTCTACTCCATA
RMS037	GA	228	59.9	AACCTCGGAGGCCGATTCAC	52.1	AGTTTCCCTGCCAGATAAGC

RMS038	GA	115	50.3	GTGATAAGAGCAAACAAAGATGG	53.8	CTCGCGGAAGGCCTCAAAA
RMS039	2xGA	124	52.1	GCTGGTTCTCCAATCAACAA	52.1	CAGCTCAGCAAAGGGGACTA
RMS040	GT	143	46.6	AACCCCAAACCTCCTAAACT	45.7	TCTGTATCTACTGTGGCTAACCC
RMS041	GA	249	49.2	TIAACCCAAAGCACCACAAAT	48.5	ACCTTCACCGATGTATCACC
RMS042	AT&GT	181	55.4	GCATGGCAGGCTCTTCAC	55.5	ATGCCAACCGTCTCAGTCACCC
RMS043	GA	215	52.6	GATCAAAGAGATGGGTCTCTCTC	54.6	AGGGGAATCTTGTAAAAGTGTTC
RMS044	AT	204	49.6	ACCGATGGATGGCAATAAC	49.7	ATACAGGACATAACGGCTACC
RMS045	AT&GT&AT	233	40.0	GAAAATAAGGACATCATCTAC	41.4	GGTGCGCTCATTATTTAC
	&GA					
RMS046	AT&GT	247	45.0	AAAGGATTGCTGGATGTG	42.4	TATTCGGCGTGGACTCTAT
RMS047	GA	98	51.6	GCTCCCTCAATTTCACCTCA	51.7	ACCAACCCAAATCGCTCAT
RMS048	GA&AT	197	41.8	ATAAGTATGAAAAAGTAAAATGAT	44.0	GTATACTAGAAAAACAAACTGGT
RMS049	AT&GT	178	39.9	AAAATAACACCGAAAAA	52.6	CCAACCCGTCAAGGCTAAA
RMS050	AT&GA	169	43.1	TAAGCCTAAGAAAAACTCATT	48.6	CAGCCGTCAAGATTCACTTG
RMS051	GT	215	46.5	AGTAGACTGTCCATTAGC	50.9	ATACCATCAGAGAAGAGACGACAC
RMS052	GA	224	59.8	TTAGCCGTTAATTGAGTCGACAACCT	57.0	TGATGAACCCAATAGAATGAAAACA
				C	GA	
RMS053	GA	160	56.9	GGCGGTTAGCTAGTGAATCT	55.4	CCCTTACCCCTTACCCCTTGTAC
RMS054	AT&GA	239	48.8	CTGGGAGGAGAAACTCTGTCA	48.7	TAGCTTATAGTCCTGCATTGATGA
RMS055	GA	192	53.4	TGATCACAAAGAGCTTTCAAGTTAG	53.4	AGTTAGGGCGCATGTACAAGAAAAT
RMS056	GA	133	36.7	TGTGTAGATTAGCATTCC	35.2	GATCTAGGATGATCAATA

RMS057	GAA / GA	174	63.4	CGAGGTGGTAAGGGCGAACAAAG	63.5	CCCATCCAAAGCGAGACGACGAC
RMS058	GT	143	50.6	CAACCCCTGAAGCCTGAA	47.4	TTTGTAAACCCATTGACCATA
RMS059	AT&GT	126	42.6	ACAGTCTTATAGTGGCTTC	44.9	TACAGGGGTCTAATTGATACATAC
RMS060	GA	219	41.6	CATTCAATTGACTCTAACGGA	43.5	TATTCTGGTCTAACGTTATTGTAA
RMS061	GT	211	49.6	ATATCAGGCCGTCCCCATCAG	38.9	TTAGAAAATCCCCAACAT
RMS062	GA&GT	189	50.4	GCGAACGGCATTACTTGT	50.5	GGTTGTTCTGGGTGGTTTT
RMS063	GAA	90	60.4	CCACCGCCCCACATCACAAATG	59.9	GCTCTGCGGAGTGGGAATGGT
RMS064	GA, GT	227	43.7	TTTTGCAATATGTGAAGC	50.3	GATTGGTCAACCGATATGTAGAA
RMS065	GA	111	42.2	TATAGCTCGGTAGATTCAA	56.2	CCAGACTGCCCAACTCATA
RMS066	GA	198	48.8	TCCACCCACAGACCCACAG	49.5	AAGCTCCCTACGATTTCACTC
RMS067	GA	169	50.2	CAATCTGCAATCCGAATTC	47.5	ATGGTGA AAAACAGAAATACTACA
RMS068	GA	199	52.8	GTGGCTTCTGGTCCATT	51.8	CATTGGTCTACGTTTCACTTC
RMS069	GT&GA	232	53.0	TCGGAGATTAAAGAGTGGGTGAGT	56.9	GTGCCCACTAACCCAAACCATC
RMS070	GA	173	45.2	TGCCTCTCGATAACAAACC	54.0	ATAAGAACCAATACCCCGAACAG
RMS071	GT	90	44.4	GTTAGCATCTGGCACATTAT	46.3	AGTTCCCTGACCAGCAGAG
RMS072	GA	110	46.3	TTAGCTCAAGAACATTCAAAAG	51.9	TCCAAACCGAGCTAACAAAAACT
RMS073	AT&GT/GA	156	46.0	AAACCCCTTTATGTAGAAGTAG	45.5	TAAAACATGAAATTATAACAAATAGTG
	A					
RMS074	AT&GT	237	51.5	GCTTCTATCCACAGTTCACCTC	51.0	TTCATGTCAACGCTTCTGTAAATAG
RMS075	AT&GT	237	54.4	GCCCCGTA AAAAGCCCCGTAAA	48.3	TTGGTCAACCGATATGTAGAAT
RMS076	GA	180	48.9	TGGATGCCAACACCTACAAA	58.1	CGTGGCCGGCATTCGTC

RMS077	GA&GT	154	60.375	AGGTGAACATGGGCCAACTA	57.436	TCAAAGAAATGAGTGCCTACTAAGA
RMS078	GT	112	59.585	CCATTCAAAGTGGCACGTA	60.049	CTCTACTGCCAGCAAACCA
RMS079	GA	182	59.502	CCGGTATGGAGAGGAATGAG	59.841	GCAATTATCCTGACAGAACCC
RMS080	GT	213	59.585	GCTTCAAAAGATGGGAAACCT	59.470	TTGGTATCACATTACTCTCATTCG
RMS081	GT&GA	164	57.402	TTTGACACACACACACAAACAT	59.784	GACTGAGAAAACAAGTCCGTCCT
RMS082	2xGA	113	59.469	AACAACACACACGGGAATATG	59.873	TGCAGTTGGAGTTGGAGTTG
RMS083	GT	90	60.837	GACGTCGGCACTTAGCAAC	61.720	AGGTCCCTAGCATAAGACGGC
RMS084	GT	185	59.893	GGGAGTCTCAAGAGCTACCGT	58.787	CTTCATGTAAGCCACTGGACA
RMS085	GA	204	59.923	ATGCCCATGACTATCTGCC	61.110	TCCAAGATGAAGAATTGGGG
RMS086	GA	150	60.195	TTCTGTTCATCTGGCCTCC	59.700	GTTCGTAGATTCAAGGTGGC
RMS087	GA	229	60.328	GCCCAACTATTCCCTCCACT	60.454	CCCACAGTTGTCCAACACAA
RMS088	GA	207	59.955	TCCTGATTCTGTATCATCCACTG	59.817	GAAGGCCTCAAGGTTCCCTCT
RMS089	AT&GT	161	59.107	TTCTTATGTTGGTTGGAAAGAAA	59.394	TCAAATAGTGAAGGTGGAGGA
RMS090	GT&GC	204	59.837	TGTGTGTGTATCCATGGCCT	60.080	ATCTGCAATGACAATGGCAA
RMS091	GA&GT	207	59.513	GATCAGGGTGAATAACCGAGC	59.589	GCCACTCTCTCTGTCCCTCAA
RMS092	AT&GT	208	59.546	TGAAATGAGAGACCAATTCCAA	58.762	ATCAAGTGAGCCGATGGAG
RMS093	GA	116	60.301	CGTTCTCGTTGTGTCATCG	60.540	CCCTCTCTCCAGTCACGA
RMS094	GA	175	59.918	TCCTATCCACACCGACATCA	60.125	TCACAAATACCTTCCACTCGC
RMS095	GA	163	59.649	CCAATCTCCTCAACTCCCAG	59.730	TCAGGGCTCTAAAGCTTGC
RMS096	AT&GT&AT	203	59.485	TGACCAATATGACAGAGAACAA	58.143	TGATAGCCCTACATATGGAAACATT
RMS097	GA&GT	163	60.162	ATCTGGCTGAACACCACACA	60.132	CATGCTAACTCTCCATGTTCCA

RMS098	GT / GA	172	59.790	CACGTCCCATTCCAGAATT	59.943	CCCTCAATGGAGAGCAAGAG
RMS099	GA	166	60.088	GGTCTGGTTCCCTTGAGGTGA	60.096	CTCTCTCGTCCGAAAGCATIC
RMS100	GT&AT	169	59.556	AGAGCTCCGGCTCTGGATATG	59.911	AGGCCAAAGCTTACCGTGCAT
RMS101	GA	133	59.291	GAAGAGACTGAAAGCTTGAGGA	60.388	CTCCTCTCACTCCCTCACCA
RMS102	GT	170	59.891	AACTAAATGGTGAAGATGCCAA	59.642	GGAAATTTCGTTCCCTTAAGCTAACGTT
RMS103	GT	193	59.960	ATTATGCGAACCAACGAGG	60.214	TGGCAGCATTCTCCCTAAC
RMS104	GA	209	57.011	CTAAAGCTTGAGCAAACAAATG	59.955	GGAGTATTGGCGTAGGTGA
RMS105	GT&AT	189	58.857	TTGGTCTTAATGCCCTATCCC	60.053	CCAGCCCTAGCCATAATTGA
RMS106	GA	189	58.100	CTCTCCCTCTCTGCATCAAA	59.982	CCTCTCTTGCAACCCAAG
RMS107	AT&GT	194	60.073	CGACCTTGAACTCGATGGAT	59.266	CATGAAAGTGGAGCTAGCTAACGAA
RMS108	GA	183	61.395	GATCGCCATGGCATGTAAAG	59.592	TTCTCTAGTTCCGGCTGC
RMS109	GT	115	59.625	TGCAAACCTAAATTCCACAGAA	60.012	TGGCCTCTACAGCTCCTGTT
RMS110	GT	194	59.673	TATGAGAATGAGCGTGTGGG	60.532	TTCCCTCTCATTCCCTCC
RMS111	GA	135	57.738	TTAGTCATCATCTTCAGTATCAAGA	59.933	ATTCATAATTGGCTTCACTGGG
			A			
RMS112	AT&GT	227	59.294	CAAGGATACCAAGTCGGAGAGA	59.813	AGAAATGGACAGCTCCGAAA
RMS113	GA	174	60.263	CATGGATTCGGTGTCTTC	59.955	GGCATCAGAAAGCTGAAAGG
RMS114	GA	224	60.134	AGTCGCATAACAGGACTGGG	59.894	TGGGATTTCGGATAAGTGC
RMS115	GA	222	60.027	CGTGAAGACGCAAAGTCAA	60.059	GGAGGAGAAGGAGGATTGTG
RMS116	AT&GT	228	59.989	CACCCACTGGAATACTGGCT	58.724	CGACAAGGCATGACCTGAAAT
RMS117	GA	199	59.950	TCTTCCTCTCACCAGCCAT	60.074	GGCCGATTGTTGACCTAGA

RMS118	(AT&)GT	168	59.075	TGGCTATGGAAAGAACATGA	59.545	TCAGACAAATAATGCGTTACCAA
RMS119	AT&GT	122	59.857	GCACGGCACACATATAACAACAA	59.807	GATATCCGCAGCCAAGAAAG
RMS120	GT	193	57.360	CAGTTGAAGAGAACCAAGGG	60.162	TGGTGGGTAGGGAAATGAAA
RMS121	GT	94	60.001	TCCTCTCCAAGACACAAATTCAA	60.999	GCCTCTGCTCTCCCTAA
RMS122	GA	229	60.822	ATTCCACTTCCTCCCA	59.874	GGATTCTTCCTGACCC
RMS123	GA	167	59.128	AAACACTCTAAGGAGGTATTCCCTAA	59.137	CGAAGTCTCCCATGGTTCT
RMS124	GT	107	57.353	TTTGTGGTCGTGTGTGTAT	58.149	AGGCACAAATACTATCCACCTG
RMS125	GA	160	60.589	AAGTGAAGACTGAGCGACCG	59.694	CTACTCCAATGTCGGCTTC
RMS126	GT	210	59.822	AACGACCCGCTAGGAGAAA	58.048	TTGTTCTGTCGAATGGGT
RMS127	GA	220	59.967	TGCCTTCTAGATTGCTGGA	60.812	TAGTGTGGTCACCCACCC
RMS128	GA	230	60.016	AGCATCACGAGCACATTCA	60.470	GCGAAGATTCAACCAATGAC
RMS129	GT	229	59.203	ACGTGCACACACTCACACAC	57.100	ACTGATGCAGTTGCTCTGA
RMS130	GA	126	59.518	CAAATCAATCTGCAAACCCA	59.833	TTTGCAGAATACCAGATGCAG
RMS131	GA	230	60.615	CGGCCAGAGATAACAGATGG	58.938	TGTTTGTGCTTAACACTACAACCTT
RMS132	GA	184	59.454	TGTGGTTATGAAATTGCTGGTG	59.956	TTCAGTTGGTTGAATGGGAG
RMS133	GA	124	59.731	TCTGCACAAATCAGCAGAAGA	59.901	ATTCTGGCAAATCCGAATG
RMS134	GA	226	58.173	TGAGCTCAAGCAATATGCAA	58.817	GGCTGTCTGATCCAGTATG
RMS135	GA	190	60.011	GACCGATGGAGAGGAATGAA	58.909	TTGCCTTCTCCCTCTGT
RMS136	GA	114	57.218	GATCATGAGAGTCGCCAA	59.939	AGAGGCAGATATGGAGCGA
RMS137	GA	228	60.362	TGTACATGATGATGGGACGC	59.847	GGCAATTGCAAAGACAGTC
RMS138	GA&andere	157	60.022	CTCTGAGAGGCCACACACCA	60.339	GCAAAACACATCCCATCATCA

RMS139	GA	187	60.169	CAAGTATCTGCTCAGGCAAGC	60.218	CCATCACATTGGCTCTTCT
RMS140	GT	123	59.792	CCAATAGCGATGCAATGAGA	59.052	TTGGCTACCACTAACCTCCC
RMS141	GT	202	58.624	ACAGAGAGACTTGACCGCTGCAT	59.668	AGCGTGTGTAGCTAGGGAGC
RMS142	2 x GA	186	60.255	TGGCCTCAACGTTCTTAC	58.588	CCTGAAATATCCCTATGTCAAGAAA
RMS143	GA	230	60.261	GTGGGAAGTGTGGGAACAAAC	59.617	GCCTCATCTGTCCCATCTTC
RMS144	GT	202	57.412	TTTATCACTGTACAAGGCATTA	59.661	GAGCTCCATGAGGTGTTCC
RMS145	2 x GA	122	60.397	TGCTCACTTACCCAGAACCC	59.350	TCTCTCTCATTTCAAGAGTAAACCC
RMS146	GT	186	59.454	ACAAGGCATTCAACCTTGGTT	58.253	TTCTGGGCTGCATAAATA
RMS147	AT&GT	191	59.583	CCAATCTCAATAACACCGAGC	59.767	TCTTTGTGCTGCTAATGCTCA
RMS148	GT	230	59.756	TTAGCAGGCATTGGCACTAT	59.698	ACCTCCAGCACCAACTCCT
RMS149	AT&GT&AT	203	59.566	CGGTGTGTAGTTGATTGGAA	60.195	TCAAATTCTGGCCTCTGTCC
RMS150	GT	209	60.251	TGCTGCAGTATGATGCCAAT	59.055	TGGAAATCCTTCCCTTCCTT

Erklärung zur obenstehenden Tabelle:

Spalte A: Name	Name des Mikrosatellitenmarkers; RMS für RosenMikroSatellit; fortlaufende Nummern von 001 bis 150
Spalte B: Motiv	Mikrosatellitenmotiv in der DNA-Sequenz, fuer das ein Primerpaar gesetzt wurde
Spalte C: Produktgrößee (bp)	anhand der DNA-Sequenz ermittelte theoretische Groesse des PCR-Produkts in der Rosensorte Lichtblick
Spalte D: Tm	theoretische optimale Annealingtemperatur des F-Primers
Spalte E: Primer F* 5'->3'	Sequenz des F-Primers
Spalte F: Tm	theoretische optimale Annealingtemperatur des R-Primers
Spalte G: Primer R 5'->3'	Sequenz des R-Primers

Diese Marker zeichnen sich durch einen hohen Grad an Polymorphismus zwischen verschiedenen Rosensorten bzw. -linien aus und detektieren in der Regel in verschiedenen Rosenlinien mehrere Allele pro genetischem Locus.

Sie sind daher für "DNA fingerprinting", Sortenidentifikation, Verwandschafts- bzw. Ähnlichkeitsstudien und alle Formen von genetischen Kartierungen, einschließlich der Kartierung von Einzelgenen und quantitativen Merkmalen (QTLs) verwendbar. Außerdem ist ihr Einsatz sehr gut für eine Automatisierung geeignet und es ist möglich, die Detektion der Produkte mit nichtradioaktiven Methoden durchzuführen. Mit Hilfe dieser erfindungsgemäßen Marker ist z.B. die Möglichkeit einer Unterscheidung nahezu aller im Handel erhältlichen Rosensorten gegeben.

Damit wird es möglich, Rosensorten und -arten, die sich bereits in der Datenbank befinden, im vegetativen Zustand zu bestimmen. Ein weiterer Vorteil der Erfindung liegt in der Identifikation oder Zuordnung anonymer Rosenherkünfte zu einer Verwandschaftsgruppe. Ferner wird es möglich, Linien, welche unter verschiedenen Sortennamen gehandelt werden, zu identifizieren. Auch kann die genetische Vielfalt einer Gruppe von Linien festgestellt werden (z.B. die genetische Vielfalt im Zuchtmaterial eines einzelnen Züchters). Es wird auch möglich, die genetische Distanz von Eltern einer geplanten Kreuzung und damit möglicherweise auch die Erfolgsaussichten der Kreuzung abzuschätzen.

## Ausführungsbeispiel

Das folgende Ausführungsbeispiel dient der Erläuterung der Erfindung und schränkt die Erfindung in keinem Falle ein.

### Verwendete Methoden

#### DNA-Isolierung

a. Präparation nach der Methode von Saghai Maroof et al. (1994) Proc. Natl Acad Sci USA 91: 5466-5470:

Etwa 1.5 g Blattmaterial wurden in flüssigen Stickstoff gemörser, mit 15 ml CTAB-Puffer versetzt und 60 min bei 65 inkubiert. Die Mischung wurde zweimal mit Chloroform extrahiert und die DNA mit Ethanol gefällt. DNA-Fäden wurden gefischt, in 70% Ethanol gewaschen und in TE-Puffer aufgenommen. Nach RNase-Verdau wurde mit Phenol und nochmals mit Chloroform extrahiert, mit Ethanol gefällt und wieder in TE gelöst.

b. DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen #69104)

100 mg Blattmaterial wurden in flüssigen Stickstoff gemörser und nach Anleitung des Herstellers verarbeitet.

In beiden Fällen wurde die Konzentration der gewonnenen genomische Rosen-DNA über ein Agarosegel abgeschätzt. Für jede Sorte wurde eine Verdünnung von 2.5 ng/ $\mu$ l in Wasser hergestellt. Je 2 $\mu$ l dieser Verdünnung wurden in PCR-Platten vorgelegt und eingetrocknet und konnten in diesem Zustand bis zur Verwendung bei Raumtemperatur bis zur Verwendung gelagert werden.

## 2. PCR-Reaktionen

Die PCR-Reaktionen wurden im 25  $\mu$ l-Volumen in einer 96-well-Mikrotiterplatte durchgeführt. Die Reaktion enthielt:

200 nM      Primer 1

200 nM Primer 2

je 200  $\mu$ M dATP, dGTP, dTTP, dCTP  
 1 x PCR-Puffer (50 mM KCl, 10mM TRIS-HCl (pH 9.0 bei 25°C), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton® X-100; wird als 10 x Stock zur Polymerase #M2668 mitgeliefert)  
 ca. 5 ng genomische Rosen-DNA  
 0.5 U Taq-Polymerase (Promega #M2668)

Die PCR wurde in GeneAmp PCR System 9700 PCR-Maschinen (Applied Biosystems) durchgeführt. Das Temperaturprofil ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

Schritt 1: Initial-Denaturierung	94°C	3 min	
Schritt 2: Denaturierung	94°C	1 min	Schritt 2-4
Schritt 3: Annealing	60°C	1 min	45x
Schritt 4: DNA-Synthese	72°C	2 min	wiederholen
Schritt 5: Final-Synthese	72°C	10 min	
Schritt 6: Kühlung	12°C	8	

### 3. Fragmentanalyse

Die Größenanalyse der PCR-Produkte wurde auf einem ABI3100-Sequenzierteil durchgeführt. Es wurden Kapillaren einer Länge von 36 cm verwendet, die mit einer aus dem Polymer POP4 (Applied Biosystems) gefüllt waren. Die Laufbedingungen waren: Injektionszeit 20 ms, Spannung: 15 kV, Laufzeit: 1080 s

Als interne Standardfragmente wurden NED-markierte Fragmente der Länge 73 bp, 121 bp, 156 bp, 235 bp, 303 bp, 377 bp und 434 bp verwendet. Die zu analysierenden PCR-Fragmente trugen für ein später im Hochdurchsatz anzustrebendes Multiplexing eine der drei Markierungsfarben HEX, ROX oder FLU.

Die Analyse der gewonnenen Daten erfolgte über die Programme GeneScan und GenoTyper (Applied Biosystems).

### Erstellen einer genomischen Plasmidbibliothek

DNA der Rosensorte „Lichtblick“ wurde aus Laubblättern isoliert. Diese DNA wurde einem Verdau mit dem Restriktionsenzym *Pst*I unterzogen. Über ein präparatives Agarosegel wurde die Fraktion der Restriktionsfragmente von ca. 5 bis 30 kb isoliert

und einem weiteren Restriktionsverdau mit dem Enzym *Mbo*I unterzogen. Über ein zweites präparatives Gel wurden die Fragmente im Bereich von 500-1500 bp isoliert und in den Plasmidvektor pUC18 kloniert. Die so entstandene genomische Plasmidbibliothek von Rose wurde transformiert (*E. coli* XL2-Blue MRF') und auf Petrischalen plattiert.

### **Entwicklung der Mikrosatelliten**

Durch einen Pipettierroboter wurden die Bakterienkolonien als Referenzbibliothek (ein Klon pro Vertiefung) in Mikrotiterplatten überführt. Die Klone wurden dann in hochdichter Anordnung („High-density-array“) auf Nylonmembranen überführt (spotting). Durch radioaktive Hybridisierung mit einem synthetischen Mikrosatelliten-Oligonukleotid (GA<sub>n</sub> oder GT<sub>n</sub>) wurden die Plasmidklone identifiziert, die einen entsprechenden Mikrosatelliten enthalten. Diese Plasmide wurden für die Sequenzierung im µg-Maßstab präpariert und sequenziert. Durch spezielle Software (Primer 3.0 bzw. DNAStar/PrimerSelect von Lasergene) wurde Primerpaare abgeleitet, die das Mikrosatellitenmotiv einschließen und ein theoretisches Produkt von 80-250 bp erzeugen.

### **Auswahlkriterien**

Durch PCR und Auftrennung der entstandenen PCR-Fragmente über ein ABI3100-Sequenzergerät von Perkin Elmer wurden Funktionalität (es entsteht ein Fragment im erwarteten Größenbereich) und Spezifität (es entstehen ein oder wenige klar ansprechbare Fragmente) der PCR mit den Primerpaaren überprüft und bei Bedarf optimiert. Zuverlässig funktionierende, polymorphe Mikrosatelliten, die eine klare Differenzierung der 30 für einen Vortest verwendeten Rosensorten erlauben, werden als Markerset für weitere Genotypisierungen ausgewählt. Die Ergebnisse aus der Untersuchung der verschiedenen Sorten werden in einer Datenbank archiviert, die es erlaubt, hinzukommende Sorten als identisch oder nicht identisch mit bereits untersuchten Sorten oder Linien zu identifizieren oder alternativ Verwandtschaft zu den bereits untersuchten Sorten zu bestimmen.

## Durchführung der Genotypisierung

Für die weitere Analyse der 84 für die Genotypisierung geeigneten Marker wurden 32 Rosenlinien verwendet (Tabelle 1). Wiederum wurde zunächst DNA präpariert, wobei größere Schwierigkeiten bei der DNA-Präparation aus den im Spätsommer 2001 erhaltenen ausgewachsenen Laubblätter auftraten. Wahrscheinlich werden die Probleme durch lösliche Kohlenhydrate verursacht, die sich in älteren Blättern ansammeln. Das Pflanzenmaterial vom Mai dieses Jahres dagegen ließ sich problemlos verarbeiten. Die Ergebnisse der Fragmentanalysen, die als "Fingerprint" einer Sorte bezeichnet werden können, wurden in einer Datenbank erfasst. Als Beispiel sind die Daten für Mikrosatellitenmarker RMS059 dargestellt (Tabelle 2).

Nach der Genotypisierung, die zweimal an unabhängig präparierter DNA durchgeführt wurde, konnten die analysierten Mikrosatellitenmarker nach ihrer Qualität in zwei Kategorien eingeteilt werden: "brauchbare" und "gute" Marker.

Als Bewertungskriterien wurden folgende Punkte herangezogen:

- wird eine überschaubare Zahl von Fragmenten (Allelen) pro Rosensorte erzeugt (in der Regel 1-4 Fragmente)?
- werden verschiedene Allele etwa gleich stark amplifiziert?
- erschweren Stotterbanden und Schattenpeaks die Auswertung?
- sind die Fragmente in unabhängigen Experimenten reproduzierbar?
- ist die Amplifikation unabhängig von DNA-Qualität und -Menge?
- besteht ein Gleichgewicht zwischen den Allelen, d.h. kommen die verschiedenen Allele im untersuchten Material etwa gleich häufig vor oder gibt es viele nur selten auftretende Allele?

In die Kategorie "gut" fielen 41 (27%) der ursprünglich 150 untersuchten funktionalen Mikrosatellitenmarker und in die Kategorie "brauchbar" 43 Marker (29%). Die anderen 66 Primerkombinationen (44%) waren bereits bei der Testung (siehe oben) als nicht nutzbar bewertet worden. Über 20 dieser für die Genotypisierung nicht nutzbaren Marker können aber für die genetische Kartierung verwendet werden.

Tabelle 1: Liste der untersuchten Rosensorten.

fortlaufende Nummer	Code	Sortenname	Laborkürzel
1	3774	Ulrike	01ULR
2	7062	Sommerliebe	02SOM
3	6982	Spreeglut	03SPR
4	3400	Sappho	04SAP
5	3296	Viridiflora	05VIR
6	5488	Kaiserin Auguste Victoria	06KAI
7	1740	Lady Susan Birch	07LAD
8	4737	Comtesse de Murinais	08COM
9	3963	Zoe	09ZOE
10	4934	Alexandre Dupont	10ALE
11	1431	Ibica	11IBI
12	4437	Dr. Georges Martin	12GEO
13	3960	Zizi	13ZIZ
14	3735	Toni Lander	14TON
15	3162	Signet	15SIG
16	7008	Una	16UNA
17	133	Spes	17SPE
18		Canary Bird	18CAN
19	6120	Mme. Alfred Carriere	19ALF
20	6650	Jan Spek	20.01.02
21	3633	Super Congo	21SUP
22	109	Minette	22MIN
23	2037	Marjorie le Grice	23MAR
24	3969	Pardinas Bonet	24PAR
25	6040	Sangerhausen	25SAN
26	5234	Abraham Zimmermann	26ABR
27		Nida Senf	27NID
28		Lovania	28LOV
29	3346	Autumn	29AUT
30	791	Bertram Park	30BER
31		Lichtblick	31LIC
32		Rosa multiflora thunb. (Japan)	32JAP

Tabelle 2: Datenblatt für Mikrosatellitenmarker RMS059. Spalten bezeichnen verschiedene Allele des Markers in Basenpaaren (bp), Zeilen bezeichnen die 32 verschiedenen Rosensorten; eine 1 steht für Anwesenheit, eine 0 für Abwesenheit eines Allels in der untersuchten Sorte. Die letzte Zeile gibt an, wie oft ein Allel im untersuchten Material beobachtet wurde. Die letzte Spalte enthält die Zahl der Allele in einer Sorte. RMS059 enthält einen Mikrosatelliten mit den dinukleotiden Wiederholungsmotiven AT und GT und zeigt daher Allele mit einem Größenunterschied von 2 bp (mit Ausnahme des größten Allels).

Sorten	121	123	125	127	129	133	137	139	144	
01ULR	1	0	0	1	1	0	0	0	1	4
02SOM	0	1	0	1	1	0	0	0	0	3
03SPR	0	0	0	1	1	0	0	0	1	3
04SAP	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2
05VIR	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
06KAI	0	1	0	1	1	0	0	0	0	3
07LAD	0	1	0	1	1	0	0	0	0	3
08COM	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2
09ZOE	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2
10ALE	1	1	0	0	0	0	0	0	1	3
11IBI	1	1	0	1	1	0	0	0	0	4
12GEO	1	0	0	1	1	0	0	0	1	4
13ZIZ	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2
14TON	1	0	0	1	1	0	0	0	1	4
15SIG	0	0	0	1	1	0	0	0	1	3
16UNA	0	1	1	1	0	0	0	0	0	3
17SPE	0	1	0	1	1	0	0	0	0	3
18CAN	0	0	1	0	1	0	0	1	0	3
19ALF	1	0	0	1	0	0	1	0	0	3
20JAN	1	0	0	1	1	0	0	0	0	3
21SUP	0	0	0	1	1	0	0	0	1	3
22MIN	0	1	0	0	1	1	1	0	0	4
23MAR	1	0	0	1	1	0	0	0	1	4
24PAR	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2
25SAN	1	1	0	0	0	0	0	0	1	3
26ABR	1	0	0	0	1	0	0	0	1	3
27NID	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
28LOV	1	0	0	1	0	0	0	0	1	3
29AUT	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
30BER	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
31LIC	1	0	0	1	1	0	0	0	1	4
32JAP	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	18	13	2	21	18	1	4	1	13	

## Ergebnisse der Genotypisierung

Im Vergleich zu anderen Kulturpflanzen wie z.B. Weizen, Raps oder Zuckerrübe zeigt Rose eine hohe durchschnittliche Anzahl von Allelen pro Sorte (letzte Spalte in Tabelle 2), eine hohe Zahl von verschiedenen Allelen pro Mikrosatellitenmarker und relativ wenige Nullallele. Das spiegelt die Heterogenität des untersuchten genetischen Materials und die komplexe Genetik von Rose wider.

Die Ergebnisse der Genotypisierung wurden für eine Verwandtschaftsanalyse der untersuchten Rosensorten über das Programm NTSYS verwendet. Dabei wurden einmal nur die mit den 41 "guten" Markern erzeugten Daten und einmal die mit allen 84 "brauchbaren" Markern erzeugten Daten verrechnet. Die Ergebnisse sind in Form von Stammbäumen in Abbildung 3 und 4 dargestellt. Auf der horizontalen Achse ist jeweils die genetische Distanz angegeben, die zwischen den theoretischen Werten 0 (keine genetische Verwandtschaft) und 1,00 (Übereinstimmung aller untersuchten Markerdaten) liegt. Beide Dendrogramme unterscheiden sich im Wesentlichen nur in der oberen Hälfte, wo Verzweigungen in sehr kurzen Abständen aufeinander folgen. Die Verwandtschaftsbeziehungen in der unteren Hälfte stellen sich bei Verwendung von 41 oder 84 Markern relativ gut übereinstimmend dar.

Das Ziel der Untersuchung, die eindeutige Unterscheidung aller untersuchten Sorten mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern, wurde damit erreicht. Für jede der Sorten existiert nun ein genetischer Fingerabdruck, der mit dem anderer Sorten verglichen werden kann. Je mehr Markerdaten zwischen zwei Sorten übereinstimmen, desto näher sind sie im Dendrogramm benachbart. Die Ergebnisse der durchgeföhrten Analyse können daher nicht nur zur Unterscheidung von Sorten verwendet werden, sondern auch Verwandtschaften und Züchtungswege offenlegen.

Unter Nutzung der Information, die im Internet zugänglich ist (z.B. [www.everyrose.com](http://www.everyrose.com), [www.rogersroses.com](http://www.rogersroses.com)), konnte im Dendrogramm von unten nach oben eine grobe Tendenz von Wildarten über alte Sorten zu moderneren Sorten festgestellt werden. Die ganz unten stehende Art *Rosa multiflora* zeigt übereinstimmend in beiden Analysen eine geringe Verwandtschaft von nur 0,22 zu allen anderen untersuchten Sorten.

Auch die Art *Rosa xanthina* mit der Sorte 'Canary Bird' ist kaum mit den übrigen Sorten

verwandt. Die Moosrosen 'Zoé' und 'Comtesse de Murinais' entstanden 1861 bzw. 1843. Die weiter oben stehenden Remontant-Hybriden 'Abraham Zimmermann' (1876) und 'Dr. Georges Martin' (1908) stammen aus der 2. Hälfte des 19. Jahrhunderts bzw. aus dem frühen 20. Jahrhundert. Die relativ junge Teehybriden 'Autumn' (1928), 'Sommerliebe' (1988) und 'Spes' (1970) stehen in der oberen Hälfte des Dendrogramms. Jeweils am oberen Ende sind die beiden Floribundarosen 'Ulrike' (1973) und 'Jan Spek' (1966) zu finden. Schlecht einzuordnen sind die Sorten 'Spreeglut' (Strauchrose, 1985), 'Sangerhausen' (Polyantha-Hybride, 1938) und 'Lichtblick' (Strauchrose, 1972). Sie bilden zwar in beiden Dendrogrammen eine Gruppe, werden jedoch in Abbildung 2 eher in die Verwandtschaft der Teehybriden und in Abbildung 3 eher in die Verwandtschaft der Floribundarosen gestellt.

### **Definierung eines Sets von 25 Mikrosatellitenmarkern**

Für die weitere Genotypisierung einer größeren Zahl von Sorten wurden aus den 41 guten Markern 25 ausgewählt, die verlässliche Ergebnisse liefern, eindeutig unterscheidbare Allele aufweisen und einen hohen Informationsgehalt haben: RMS023, RMS029, RMS038, RMS047, RMS052, RMS057, RMS059, RMS062, RMS065, RMS070, RMS077, RMS088, RMS089, RMS095, RMS097, RMS102, RMS103, RMS104, RMS112, RMS115, RMS120, RMS128, RMS139, RMS146 und RMS148.

Mit Hilfe dieses Sets sollte es möglich sein, mindestens 90% aller Rosensorten zu unterscheiden. Für eine Abstammungsanalyse z.B. zum genauen nachvollziehen von Züchtungswegen sollte aber eine größere Zahl von Markern eingesetzt werden. Generell steigt die Zuverlässigkeit solcher Analysen proportional mit der Zahl der verwendeten Marker (zumindest im Bereich von unter 100 verwendeten Markern).

Das Ziel der Erfindung, die Entwicklung von mindestens 25 für die Genotypisierung geeigneten Mikrosatellitenmarkern, ist erreicht worden. Insgesamt wurden 84 nutzbare Mikrosatellitenmarker entwickelt, von denen 41 besonders gut einsetzbar sind. Ein Set von 25 Mikrosatellitenmarkern wurde definiert, mit dem eine verlässliche Genotypisierung von weiteren Rosensorten durchgeführt werden kann. Die wichtigsten Angaben und Nutzungshinweise für den Gebrauch der Marker sind in der erstellten Datenbank enthalten.

**Nähere Beschreibung der Mikrosatellitenmarker**

Die nähere Beschreibung der Mikrosatellitenmarker wird in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete Produktgröße (bp)	Größenbereich, untere Grenze	Größenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allelanzahl pro Sorte
RMS001	GT& GC	brauchbar	TTCAAAATTGC TGCCCCCTTAG	TACCAAGTTGAGT GAGAAATAGTT	HEX	55		Genotypisierung & Kartierung	242	220	250	4
RMS002	GA	nicht nutzbar	AAATAATTTCT TTGGATA	GATTGTTTCACTATTCA	FLU	x	keine	unterschiedlich starke Allele; unzulässige Amplifikation	138			
RMS003	GA	brauchbar	TGGgaAAGGGA AAGCAAACA	AAGGTAGGCAGA AGTGACAGACAT	ROX	60		Genotypisierung & Kartierung	151	130	190	3
RMS004	GT& AT	nicht nutzbar	CAGGCCAAGG AAGGGTTAAGT AAA	CGTATGCCGTG TAGGAAGG	FLU	x	keine	keine Amplifikation	143			
RMS005	GA	nicht nutzbar	CTACCGGTGAC CAGTGACGA	ATTTGCCCTCT CCCTTTGT	FLU	x	keine	Schattenpeaks und echte Peaks v.a. im vorderen Bereich schwer zu unterscheiden; Peaks >170 bp schwach	151	130	190	3
RMS006	GT& GA	nicht nutzbar	ACGGGTCTCAT CTTCCCATTG	GTAGGTGGTCC GTCTGTCA	FLU	x	keine	keine Amplifikation	114			
RMS007	GA	nicht nutzbar	TCTTCCGACT CCGACAA	TATGCCATTCA GACTCTCAAACAC	ROX	x	keine	Fragmente polymorph, aber z.T. unter 74 bp, deshalb am ABI nicht auswertbar	171	30	180	2
RMS008	GA	brauchbar	TCTCTGCGACA AAAACAAACAC T	CCATGAAGGGCG GGAGAGGA	ROX	65		Genotypisierung & Kartierung	176	140	200	4
RMS009	CT& GT	nicht nutzbar	ATTGGAAAG ATTCTCCTAC GGTTGGGGA AATTGAAGCAG AGA	ACTTGGTAATTTC GAGCATAA TCTTTCTTCTAC AAACCCAAACCA AC	FLU	x	keine	Schattenpeaks z.T. schwer von Allelepeaks zu unterscheiden, v.a. im vorderen Bereich; 1 bp-Unterschiede	145			
RMS010	GA	nicht nutzbar			FLU	x	keine	unspezifische Amplifikation	105			
RMS011	GT	brauchbar			ROX	55		starker fast monomorpher Peak, daneben seltene Allele, unzulässige Amplifikation; 10 bp-Allel sehr schwach	190	170	290	1

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete Produktgröße (bp)	Größenbereich, untere Grenze	Größenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel-anzahl pro Sorte
RMS012	GT	nicht nutzbar	ATAGAAAAATA GAGGGGGTTG G	GATCGAAAAAGTG GTCAAAATA	FLU	60	Kartierung	Neigung zu unspezifischer Amplifikation	141	100	200	4
RMS013	GA	nicht nutzbar	GCCCTTAGCCG GGTTTTCAA	GATCAAATAACCGA ACTAACAAAG	HEX	60	Kartierung	Stotterbanden	208	150	220	1
RMS014	GA	nicht nutzbar	TATTCTTTCTTC CCACCGACGA C	CCTCACTGCCAA CCCAACTGT	FLU	55	keine	nicht reproduzierbarer p/a-Polymorphismus	124	240	300	1
RMS015	GA	brauchbar	TAATGTAGGCA GATATAAAGGA GT	GCAGCTGCACAA CAAGGAA	ROX	55	Genotypisierung & Kartierung	unterschiedlich starke Allele	185	120	230	3
RMS016	GA	nicht nutzbar	GGCCTGGACC TTTCTCATTTG	AACCGCTGCTGC TTTCATTTT	FLU	x	keine	unspezifische Amplifikation	121			
RMS017	AT& GT	brauchbar	AGGTCCCCGTTA TTTCAGG	AGTTGGCTTATG GCTTTT	HEX	55	Genotypisierung & Kartierung	"Igel" bei ca. 180 bp, große Allele relativ schwach	246	200	270	3
RMS018	GT	nicht nutzbar	TTTGGGGGG TAAGTTTT	TTGGCCAATAAG GAAGACA	FLU	x	keine	keine Amplifikation	125			
RMS019	GA	nicht nutzbar	ACCGTTCCAT TACCCCTTCAC C	CGTGGCCATGg AttTTGTA	FLU	x	keine	keine Amplifikation	104			
RMS020	GA	nicht nutzbar	AGGGGGCCAT GCAAAATCAA	TTCCCTAACGCAA ACTATGTAAT	HEX	x	keine	monomorph mit schlecht reproduzierbarer Amplifikation -> evtl. als Sensor für DNA-Menge und -Qualität geeignet	239	220	260	1
RMS021	GA	nicht nutzbar	AATTCCCTTT ACCCAAAAACAC	CCGGCGAACGTC CCTATG	ROX	x	keine	zu schwache Amplifikation	188			
RMS022	GA	nicht nutzbar	AAGAAGATAAA TTAGGGGGAAA AA	GCGGAAACATATT GATTGGT	ROX	x	keine	keine Amplifikation	170			
RMS023	GT	gut	TTTGCTATTAA TACAGATGAA	TAACAAATAAA TGGGGAGTAA T	ROX	50	Genotypisierung &		170	140	190	2

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete ProduktgröÙe (bp)	GröÙenbereich, untere Grenze	GröÙenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel-anzahl pro Sorte
					Kartierung							
RMS024	AT& GT	brauchbar	ACTACTGTaaa ATATGAAAAAT CC	GTAGTAGCGGGT GCAAGAAAATA	HEX	55	Genotypisierung & Kartierung	Allele verschieden stark: Allele >200 bp meist schwach; nicht gut, aber reproduzierbar	200	170	250	3
RMS025	AT / GT	nicht nutzbar	TAATGTAAGCT AACTAATCT	TTTTAAATTTTG GTGGAGA	ROX	x	keine	keine Amplifikation	167			
RMS026	GT	nicht nutzbar	ATAGATATGTT TGGGTTCA	AATGTCAGGTT TGTATG	FLU	x	keine	Schwache und unzuverlässige Amplifikation	129			
RMS027	AT& GT	gut	ACCGTTGTGCT TATCAGGA	ATTGGTGGTGC TTTACATTAC	ROX	55	Genotypisierung & Kartierung	Peaks >160 bp z.T. sehr schwach; Schattenpeaks im vorderen Bereich	189	120	200	3
RMS028	AT& GT	nicht nutzbar	TAGGCAAGGACC ATgAACCGAG	TGTGGCTGTGTTG CTTGTGTA	HEX	x	keine	unspezifische Amplifikation	237			
RMS029	GA	gut	GGATAAAACCA ACGGGACAGA CTC	TCCGACACCATC CCTCCTACATAA	HEX	65	Genotypisierung & Kartierung	1 bp-Unterschiede zwischen den Allelen	201	190	230	3
RMS030	GA	brauchbar	GATAAAATTCA AGGGGAGAG	AAAAAGATGAACG ACCGAAATAAT	HEX	55	Genotypisierung & Kartierung	einige Linien mit 7 Peaks, sonst nur 1-2 Peaks	201	150	210	2
RMS031	GA	nicht nutzbar	TATATTAAGA ACAAAGTGAGAA C	GTGGCTATCGAA AAACAA	HEX	x	keine	zu schwache Amplifikation	202			
RMS032	AT& GT	nicht nutzbar	AGAAACCAACC TTAGCAT	AACCATCCATT TCAGTCAT	ROX	x	keine	zu schwache Amplifikation	193			
RMS033	GA	nicht nutzbar	CAAGAGATGTC GGAAAAGCagg AAGT	TGCACACCCAA TTTACAAACCCAC A	HEX	60	Kartierung	Stotterbanden, Allele nicht eindeutig ansprechbar	203	160	240	4
RMS034	GA	brauchbar	GCTTCTCGTC	CTCCCGCTCAA	FLU	60	Geno-	Stotterbanden	136	110	190	3

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markierung	Kommentar	Temperatur-optimum	Anwendung	erwartete ProduktgröÙe (bp)	GröÙen-bereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel-anzahl pro Sorte
			TCGTGCTCTC	TCAAATAATCTC		typisierung & Kartierung					
RMS035	GA	brauchbar	CCTCCCTGGCA	ATCGGCTATCCA CATCGTCTACAC	HEX	Genotypisierung & Kartierung	55	Stotterbanden	229	180	250
RMS036	GA	nicht nutzbar	CTCGGGCCC AAATAACAAAT	TTGCCCTTACATT A TTCTCTACTCCAT	HEX	keine	x	zu schwache Amplifikation	235		4
RMS037	GA	gut	AACCTCGGAGC CGCATTTCAC	AGTTTCCCTCGC CAGATAAGC	HEX	Genotypisierung & Kartierung	60	Genotypisierung & Kartierung	228	180	240
RMS038	GA	gut	GTGATAAGAGC AAAACAAGATG G	CTCGGGAAAGCC TCAAAA	FLU	Genotypisierung & Kartierung	55	Allele >150 bp stottern und sind relativ schwach	115	100	180
RMS039	2xG A	brauchbar	GCTGCTTTCTC CAATCAACAA	CAGCCTAGCAAA GGGGACTA	FLU	Genotypisierung & Kartierung	60	Stotterbanden, 1 bp-Unterschiede	124	80	150
RMS040	GT	nicht nutzbar	AACCCCAACT TCCTAAACT	TCTGTATCTACT GTGGCTAAC	FLU	Kartierung	55	zu starkes Stottern	143	130	160
RMS041	GA	nicht nutzbar	TTAACCCAAAG CACCAAAAT	ACCTTCACCGAT GTATCACC	HEX	Genotypisierung & Kartierung	55	keine zu unspezifische Stotterpeaks	249		2
RMS042	AT& GT	brauchbar	GCATGGCCAG GCTCTTCAC	ATGCCAAACGTC TCAGTCAAACC	ROX	Genotypisierung & Kartierung	60	Neigung zu Unspezifität; nur im Bereich 180 bis 272 bp auswerten (evtl. nur <200 bp)	181	170	300
RMS043	GA	brauchbar	GATCAAAGATG	AGGGAAATCTT	HEX	Genotypisierung & Kartierung	60	Stotterbanden	215	200	240

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete ProduktgröÙe (bp)	GröÙenbereich, untere Grenze	GröÙenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel-anzahl pro Sorte	
			GCTTCTCCTCTC	GAAAGTCGTTTC				typisierung & Kartierung					
RMS044	AT	brauchbar	ACCGATGGATG GCAATAAC	ATACAGGACATA AACGGCTTAC	HEX	55		Genotypisierung & Kartierung		schlechte Reproduzierbarkeit; Amplifikation evtl. stark abhängig von DNA-Menge oder -Qualität	204	190	220
RMS045	AT& GT& AT& GA	brauchbar	GaaaaTAAGGA CATCATCTAC	GGTGCCTCCATT ATTAC	HEX	55		Genotypisierung & Kartierung		Stotterbanden, dadurch sind Heterozygote mit 2 bp-Unterschieden schwer auszuwerten; zusätzliche schwache Allele	233	150	240
RMS046	AT& GT	brauchbar	AAAGGATTGCT GGATGTG	TATTGGCGTGGAA CTCTAT	HEX	55		Genotypisierung & Kartierung		p/a-Polymorphismus des 248 bp-Allels (genomspezifischer Marker?); empfindlich für DNA-Kontaminationen	247	200	260
RMS047	GA	gut	GCTCCCTCAATT TCCCACCTCA	aCCAAACCCAAATT CGCTCAT	FLU	60		Genotypisierung & Kartierung		74 bp-Peak lässt sich nicht immer markieren	98	70	110
RMS048	GA& AT	nicht nutzbar	ATTAAGTATGAA AAAGTAAAATG AT	GTATACTAGAAA AACAAAAACTGGT	ROX	x	keine	Genotypisierung & Kartierung		zu schwache Amplifikation	197		3
RMS049	AT& GT	nicht nutzbar	AAAAATAACAAC CGAAAAAA	CCAAACCCGTCAA GGCTAAA	ROX	x	keine	Genotypisierung & Kartierung		zu schwache Amplifikation	178		
RMS050	AT& GA	brauchbar	TAAGCCTAAGA AAAACTCATT	CAGCCGTCAGAT TCACCTG	ROX	50		Genotypisierung & Kartierung		amplifiziert sehr schwach, zeigt nur p/a-Polymorphismus des 177 bp-Allels mit einer Ausnahme: 21SUP hat 175 bp-Allel	169	140	250
RMS051	GT	brauchbar	AGTAGACTGTC CTCCATTAGC	ATACCATCAGAG AAGAGACAC	HEX	55		Genotypisierung & Kartierung		wenig Polymorphismus, Linien mit Nullallelen zeigen einen nicht immer	215	160	240

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete ProduktgröÙe (bp)	GröÙenbereich, untere Grenze	GröÙenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel-anzahl pro Sorte
							Kartierung	reproduzierbaren 169 bp-Freak				
RMS052	GA	gut	TTAGCCGTTAA TTGAGTCGACA ACCTC	TGATGAACCCAA TAGAAATGAAAAC AGA	HEX	60	Genotypisierung & Kartierung	trotz Stotterbanden gut auswertbar	224	160	250	3
RMS053	GA	nicht nutzbar	GGGGTAGCT TCT	CCCTTACCCtAC cCCTTGTtAC	ROX	65	keine	unspezifische Amplifikation	160			
RMS054	AT& GA	brauchbar	CTGGGAGGAG AACTcTgtCA	TAGCTTATTAGTC TGCAATTGATGA	HEX	50	Genotypisierung & Kartierung	241 bp-Allel schwach, wenn kleineres Allel vorhanden	239	190	250	1
RMS055	GA	brauchbar	TGATCACAAGA GCTTTCAAGT TTAg	AGTTAGGGCAT GTACAAGAAAT	ROX	55	Genotypisierung & Kartierung	komplexes Muster	192	180	220	4
RMS056	GA	nicht nutzbar	TGTGTAGATTAA GCATTCC	GATCTAGGATGA TTCAATA	FLU	50	Kartierung	Doppel- und Dreifachpeaks nicht auswertbar	133	110	170	3
RMS057	GAA / GA	gut	CGAGGTGGGT AAGGGGAaca AAG	CCCATCCAAAGC GAGACGACGAC	ROX	60	Genotypisierung & Kartierung	viele 1 bp-Unterschiede, die aber reproduzierbar sind	174	150	200	3
RMS058	GT	gut	cACCCCTGAA GCCTGAA	TTTGTAACCCATT TGACCATATA	FLU	55	Genotypisierung & Kartierung	Z.T. sehr starke Amplifikation, dadurch auch starke Schattenpeaks; große Allele schwach	143	120	200	3
RMS059	AT& GT	gut	ACAGCTTATA GTGGCTTCC	TACAGGGTTCTA ATTGATACATAC	FLU	55	Genotypisierung & Kartierung	Allele >130 sind manchmal relativ schwach	126	110	150	3

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete ProduktgröÙe (bp)	GröÙenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel-anzahl pro Sorte
RMS060	GA	brauchbar	CATTCAATTGA CTCTAAGGA	TATTCTGGTCTAA GCTATTGTAA	HEX	50	Genotypisierung & Kartierung	schwach und unzuverlässig, aber evtl. genomspezifisch	219	205	260
RMS061	GT	brauchbar	ATATCAGCCGT CCCATCAG	TTAGAAAATCCC AAACAT	HEX	50	Genotypisierung & Kartierung	gut reproduzierbare Nullallele, evtl. genomspezifisch	211	190	240
RMS062	GA& GT	gut	GCGAACGGCA TTTACCTGT	GGTTGTTCTGGG TGGTTTTT	ROX	55	Genotypisierung & Kartierung	1 bp-Unterschiede	189	150	200
RMS063	GAA	gut	CCACCGCCCC CAATCACAAATG	GCTCTGGGGAGT GGGAATGGT	FLU	60	Genotypisierung & Kartierung	zwei Allele < 80 bp; Schattenpeaks und Allele im Bereich um 80 bp überlagern	90	60	100
RMS064	GA, GT	nicht nutzbar	TTTTGCAATT GTGAAGC	GATTGGTCAACC GATATGTAGAA	HEX	50	Genotypisierung & Kartierung	keine	unspezifische Amplifikation	227	2
RMS065	GA	gut	TATAGCTCGGT AGATTCAA	CCAGACTGCC CAACTCATA	FLU	55	Genotypisierung & Kartierung	viele 1 bp-Unterschiede, die aber reproduzierbar sind	111	90	150
RMS066	GA	gut	TCCACCCACAG ACCACAG	AAGCTCCCTACG ATTCACTC	ROX	60	Genotypisierung & Kartierung	Schattenpeaks und Allele schwer unterscheidbar, 1 bp-Unterschiede	198	170	220
RMS067	GA	nicht nutzbar	CAATCTGCAAT CCGAATTC	ATGGTGAAAAAC AGAAAATACTACA	ROX	x	keine	zu schwache Amplifikation	169		
RMS068	GA	nicht nutzbar	GTGGCGCTTCT GCTCCATT	CATTGGTGTCTAC GTTTTCACTTC	ROX	x	keine	keine Amplifikation	199		
RMS069	GT& GA	nicht nutzbar	TGGGAGATTAA GAGTGAGGTgA	GTGCCCACTTAC CCAAACCATC	HEX	65	Kartierung	starke Stotterbanden; "Igel" bei 235 bp	232	170	250

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5'->3'	Primer 2 (R), 5'->3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete ProduktgröÙe (bp)	GröÙenbereich, untere Grenze	GröÙenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel-anzahl pro Sorte
			GT									
RMS070	GA	gut	TCCTCTCGAT ACAAACC	AATAAGAACCA TACCCCGAAGAG	ROX	50		sehr gute, von der DNA-Qualität relativ unabhängige Amplifikation, keine Ausfälle oder Nullallele, 158 bp- und 177 bp-Allel z.T. unsicher anzusprechen (Vorpeak zu größerem Fragment oder eigenes Allel?)	173	150	200	3
RMS071	GT	brauchbar	GTAGGCATCTG GCACATTAT	AGTTCCCTTGAC CAGAG	FLU	55		Genotypisierung & Kartierung				
RMS072	GA	gut	TTAGCTCAAGA ATTCATCAAAG	TCCAAACCGAGC TAAGAAAAACT	FLU	55		Genotypisierung & Kartierung				
RMS073	AT& GT/ GAA	brauchbar	AAACCCctTTTA GTAGAAAGTAG	TAAACATGAAAT TATACAAATAG G	ROX	50		Genotypisierung & Kartierung				
RMS074	AT& GT	nicht nutzbar	GCCTCTATCCA CAGTTCACCT C	TTCATGTCAACG CTTCTGTAATAG	HEX	x	keine	Genotypisierung & Kartierung				
RMS075	AT& GT	nicht nutzbar	GCCCCGAAAG CCGGTAAA	TTGGTCAACCGA TATGTTAGAAT	HEX	x	keine	Genotypisierung & Kartierung				
RMS076	GA	nicht nutzbar	TGGATGCAAAAC ACCTACAAA	CGTCGCCGGCAT TCGTC	ROX	x	keine	Genotypisierung & Kartierung				
RMS077	GA& GT	gut	AGGTGAACATG GCCAAACTA	TCAAAGAATGAG TGCCCTACTAAGA	ROX	60		Genotypisierung & Kartierung				
RMS078	GT	brauchbar	CCATTCCAAG TTGCACGTA	CTCTACTGCCAG CAACCAACA	FLU	60		Genotypisierung				
								unzuverlässige Amplifikation, evtl. DNA-				
									112	100	140	2

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' → 3'	Primer 2 (R), 5' → 3'	Markie- rung	Tempe- ratur- opti- mum	Anwen- dung	Kommentar	erwart- ete Produ- kt- größe (bp)	Größen- bereich, untere Grenze	Größen- bereich, obere Grenze	durch- schnit- liche Allel- anzahl pro Sorte	
RMS079	GA	brauchbar	CCGGTATGGA GAGGAATGAG	GCAAATTATCCTT GACAGAACCC	ROX	60		qualitätsabhängig; Nullallele, schwache Allele, Überschneidungen von Vorpeaks und Allelen	182	160	210	2	
RMS080	GT	brauchbar	GCTTTCAAGA TGGAAACCT	TTGGTATCACATT TACTCTCATTCGC	HEX	60		sehr schöne Alleleiter, aber durch Stotterbanden und schwache Peaks schwierige Auswertung	213	180	230	3	
RMS081	GT& GA	nicht nutzbar	TTTGACACACA CACAGAAACAT	GACTGAGAAACA AGTCGGTCTT	ROX	60		Geno- typie- rung & Kartie- rung	Stotterpeaks, verschieden starke Allele	164	110	180	2
RMS082	2xG A	brauchbar	ACAAACACACG CGGAATATG	TGCAGTTGGAGT TGGAGTTG	FLU	55		Geno- typie- rung & Kartie- rung	starke Schattenpeaks	113	90	150	1
RMS083	GT	nicht nutzbar	GACGTCCGCA CTTTAGCAAC	AGGTCCCTAGCA TAGACGGC	FLU	x	keine	Geno- typie- rung & Kartie- rung	unspezifische Amplifikation	90			
RMS084	GT	gut	GGGAGTCTCAA GAGCTACCGT	CTTCATGTAAGC CACTGGACA	ROX	60		Geno- typie- rung & Kartie- rung	nur Fragmente <200 bp auswerten; 181/183 bp- Doppelpeaks schwer zu interpretieren	185	160	210	3
RMS085	GA	nicht nutzbar	ATGCCCATGAC TATCTTGCCT	TCCAAGATGAAG AATTGGGG	HEX	x	keine	Geno- typie- rung & Kartie- rung	unspezifische Amplifikation	204			
RMS086	GA	brauchbar	TTCTGTTCTATC TGGCCTCC	GTTCGTAGATTC AGGTGGCC	FLU	55		Geno- typie- rung & Kartie- rung	unzuverlässig, schwer auszuwerten, stottert stark	150	120	170	2
RMS087	GA	nicht nutzbar	GCCCAACTATT CCTCCCCACT	CCCACAGTTGTC CAACACAA	HEX	x	keine		zu schwache Amplifikation	229			
RMS088	GA	gut	TCCTGATTGTC	GAAGGGCTCAAG	HEX	65	Geno- typie- rung & Kartie- rung	Geno- typie- rung & Kartie- rung	gleichmäßig stark	207	180	220	3

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5'→3'	Primer 2 (R), 5'→3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete ProduktgröÙe (bp)	GröÙenbereich, untere Grenze	GröÙenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel-anzahl pro Sorte
			ATCATCCACTG	GTTCCTCT			typisierung & Kartierung	Amplifikation				
RMS089	AT& GT	gut	TTCTTATTGTTG GTTGGAAAGAA A	TCAAATAGTGAGG TGCGAGGA	ROX	55	Genotypisierung & Kartierung	Verlässlich amplifizierender Marker mit 1 bp-Polymorphismen; Heterozygot im Bereich 167-168-169 bp schwer anzusprechen	161	150	190	3
RMS090	GT& GC	gut	TGTGTTGATC CATGGCCT	ATCIGCAATGAC AATGGCAA	HEX	.60	Genotypisierung & Kartierung	Nullallele, einige schwach amplifizierende Linien	204	150	220	2
RMS091	GA& GT	brauchbar	gAtcAGGGTgAat ACCGAGC	gCCACTCTTCTCT GTCTCTCAA	HEX	55	Genotypisierung & Kartierung	Stotterbanden, unterschiedlich starke Allele	207	190	270	2
RMS092	AT& GT	nicht nutzbar	TGAAATGAGAG ACCAATTCCA A	ATCAAGTGAGCC GATGGAG	HEX	x	keine	unspezifische Amplifikation	208			
RMS093	GA	nicht nutzbar	cGTTCTCGTTG TTGTCATCG	CCCTCTCTCTC AGTCACGA	FLU	60	Kartierung	unspezifische Amplifikation	116	80	210	3
RMS094	GA	brauchbar	TCCTATCCACA CCGACATCA	TCACAAATACCTT CCACTCGC	ROX	60	G Genotypisierung & Kartierung	verschieden starke Doppelpeaks schwer anzusprechen	175	150	190	3
RMS095	GA	gut	CCAATCTCTC AACTCCAG	TCAGGGCTTCTA AAGCTTC	ROX	60	Genotypisierung & Kartierung	Doppelpeaks (ersten Peak auswerten)	163	130	190	3
RMS096	AT& GT& AT	nicht nutzbar	TGACCAATATG ACAGAGAACCA A	TGATAGCCTTAC ATATGGAAACAT T	HEX	x	keine	keine Amplifikation	203			
RMS097	GA&	gut	ATCTGGCTGAA	CATGCTAACTCT	ROX	65	Geno-	Allele manchmal	163	150	190	2

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5'→3'	Primer 2 (R), 5'→3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete ProduktgröÙe (bp)	GröÙenbereich, untere Grenze	GröÙenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel-anzahl pro Sorte
	GT		CACCAACACA	CCATGTTCCA				typisierung & Kartierung				
RMS098	GT / GA	gut	CACGTC CCAATT CCAGAATT	CCCTCAATGGAG AGCAAGAG	ROX	60		Genotypisierung & Kartierung	172	150	190	1
RMS099	GA	nicht nutzbar	GGTCTGGTCC TTAGGGTGA	CTCTCTCGTCG AAAGCATT	ROX	x	keine	Genotypisierung & Kartierung bis auf wenige Ausnahmen bis auf wenige Ausnahmen monomorph	166			
RMS100	GT& AT	nicht nutzbar	AGAGCTCCGCT CTGGATATG	AAGGCCAAAGCTT ACGTGCAT	ROX	x	keine	Genotypisierung & Kartierung keine unspezifische Amplifikation	169			
RMS101	GA	nicht nutzbar	GAA GAGACTGA AAGCTTGAAGG A	CTCCCTCTCCACT CCTCACCA	FLU	65		Genotypisierung & Kartierung keine Amplifikation unterschiedlich starke Allele, Schattenpeaks nicht von Allelepeaks zu unterscheiden; reproduzierbar	133	110	160	3
RMS102	GT	gut	AACTAAATGGT TGAGATGCCAA A	GGAA TTTCGTT CCTTAAGCTAAGT T	ROX	55		Genotypisierung & Kartierung kleine Fragmente (bis 174 bp) oft schwächer	170	160	210	2
RMS103	GT	gut	ATTATGCGAAC CAAACGAGG	TGGCAGCATTCT CCTTAAC	ROX	55		Genotypisierung & Kartierung 1 bp-Unterschiede	193	180	220	2
RMS104	GA	gut	CTAAAGCTTGA GCAAAACAAATG	GGAGTATTGGCC GTAGGTGA	HEX	60		Genotypisierung & Kartierung weitere Peaks bei ca. 400 bp	209	160	220	1
RMS105	GT& AT	nicht nutzbar	ttgtCTTAATGC CCTATCCC	CCAGCCCTAGGCC ATAATTGA	ROX	60		Genotypisierung & Kartierung Stotterbanden	189	80	200	3
RMS106	GA	nicht nutzbar	CTCTCCCTCTC TGGCATAAA	CCTCTTCTCTGC AACCCAAG	ROX	55		Genotypisierung & Kartierung Stotterbanden	189	150	230	3
RMS107	AT&	gut	CGACCTTgaAC	CATGAAAGTGGGA	ROX	60		Genotypisierung & Kartierung nur zwei Hauptallele, 205	194	170	210	2

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5'→3'	Primer 2 (R), 5'→3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete ProduktgröÙe (bp)	GröÙenbereich, untere Grenze	GröÙenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel-anzahl pro Sorte
	GT		TCGATGGAT	GCTAGCTAAGAA				typisierung & Kartierung	bp schwächer als 203 bp			
RMS108	GA	brauchbar	gATCGGCCATGg	TTCTTCTAGTTTCGGCTGC	ROX	55		Genotypisierung & Kartierung	schlechte Reproduzierbarkeit; Auswertung evtl. auf starke Produkte beschränken	183	150	200
RMS109	GT	nicht nutzbar	TGCAAAACCTAA	TGGCCTCTACAGCTCCTGTT	FLU	x	keine	unspezifische Amplifikation		115		1
RMS110	GT	brauchbar	TATGAGAATGATGAGCGGTGTGGG	TTCCCTCTCATTCCTCTCCCC	ROX	60		Genotypisierung & Kartierung	schwache 207 und 211 bp-Allele schwer ansprechbar	194	180	220
RMS111	GA	nicht nutzbar	ttGTCATCATCTGAA	ATTCAATTGGCTTCACTGGG	FLU	x	keine	unspezifische Amplifikation		135	90	180
RMS112	AT& GT	gut	CAAGGATACCA	AGAAATGGACAGCTCCGAAA	HEX	60		Genotypisierung & Kartierung	z. T. ungleichmäßige und unzuverlässige Amplifikation; kein reproduzierbares Nullallel	227	210	250
RMS113	GA	gut	CATGGATTGCG	GGCATCAGAAAGCTGAAAG	ROX	65		Genotypisierung & Kartierung	viele Nullallele, Stotterbänder	174	160	200
RMS114	GA	nicht nutzbar	AGTCGGCATAAC	TTGGGATTTCGGATAAGTGC	HEX	60		Kartierung	schwache Amplifikation, Stotterbänder, Nullallele, schlecht reproduzierbar	224	160	250
RMS115	GA	gut	CGTGAAGACGCAAAGTCAAA	GGAGGAGAAAGGAGGATTGTG	HEX	65		Genotypisierung & Kartierung	meist nur ein Allel pro Linie, 221 bp-Allel neben 224 bp-Allel schwer anzusprechen, einige Linien mit schwacher Amplifikation	222	200	230
RMS116	AT&	brauchbar	cAccCActGGAA	CGACAAGCATGA	HEX	60		Geno-	viele Nullallele,	228	160	240

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' > 3'	Primer 2 (R), 5' > 3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete ProduktgröÙe (bp)	GröÙenbereich, untere Grenze	GröÙenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel-anzahl pro Sorte
	GT		TACTGGCT	CCTGAAAT			typisierung & Kartierung	Stotterbanden				
RMS117	GA	brauchbar	TCTTCCTCTCTACCGCCAT	GGCCGATTGTTGACCTAGA	ROX	60	Genotypisierung & Kartierung	Schattenpeaks, aber klar differenzierte Allele	199	170	230	2
RMS118	(AT&T)GT	brauchbar	TGGCTATGGAGAAACATGA	TCAGACAAATAATGCCATTACAA	ROX	60	Genotypisierung & Kartierung	Schattenpeaks	168	150	210	2
RMS119	AT&GT	nicht nutzbar	GCACGCAACACATATAAACAAACAA	GATATCCGCAGCAAGAAAG	FLU	65	Kartierung	nicht reproduzierbare Peaks; z. T. <74 bp	122	50	130	2
RMS120	GT	gut	CAGTTGAAGAGAACCAAGGG	TGGTGGTAGGAAATGAAA	ROX	55	Genotypisierung & Kartierung	Schattenpeaks bei ca. -13 bp	193	170	210	3
RMS121	GT	nicht nutzbar	TCCTCTCCAAgACACAATAATTAA	GCCCTCTCTGCTCTCCCTAA	FLU	55	Kartierung	Stotterbanden	94	70	130	5
RMS122	GA	brauchbar	ATCCCACCTTCCATCCCTTCCC	GGATTCTTTCCCTCTGACCC	HEX	60	Genotypisierung & Kartierung	Schattenpeaks	229	190	250	3
RMS123	GA	nicht nutzbar	AAACACTCTAACTAA	CGAAGTCTCCCA	ROX	x	keine	Stotterbanden	167			
RMS124	GT	nicht nutzbar	TTTGTGGTGTGTGTAT	AGGCACAAATACATCCACCTG	FLU	65	Kartierung	schwache Amplifikation, viele Ausfälle	107	80	270	2
RMS125	GA	brauchbar	AAGtGAAGACTGAGCGACCG	CTACTCCAATGTCGCCTCC	ROX	60	Genotypisierung &	Schattenpeaks, große Fragmente meist schwach	160	140	190	3

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete Produkröße (bp)	Größenbereich, untere Grenze	Größenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allelanzahl pro Sorte
					Kartierung							
RMS126	GT	brauchbar	AACGACCGCCT AGGAGAAA	TTGTTTCTGTTG AATGGGT	HEX	60	Genotypisierung & Kartierung	p/a-Polymorphismus des 211 bp-Allels (genomspezifischer Marker?)	210	190	240	1
RMS127	GA	nicht nutzbar	TGCCTTCTAG ATTGGCTGGA	TAGTTGTTGTC ACCCACCC	HEX	60	Kartierung	Stotterbanden, zu komplexes Bandenmuster	220	200	260	3
RMS128	GA	gut	AGCATCACGAG CACATTGAG	GCGAAGATTCA CCAATGAC	HEX	65	Genotypisierung & Kartierung		230	190	260	3
RMS129	GT	brauchbar	ACGTGCACACA CTCACACAC	ACTGATGCAATT TGCTCTGA	HEX	60	Genotypisierung & Kartierung	verschieden starke Allele	229	220	270	2
RMS130	GA	nicht nutzbar	CAAATCAACT GCAAACCCA	TTTGGAAATAC AGATGCAG	FLU	60	Kartierung	zu viele Fragmente (v.a. in 04SAP und 18CAN)	126	80	220	5
RMS131	GA	nicht nutzbar	CGGCCAGAGA TAACAGATGG	TGTTGTTGCTTA ACTACTACAAC TT	HEX	60	Kartierung	Stotterbanden	230	210	310	2
RMS132	GA	brauchbar	TGTGGTTATGA ATTGGCTGGTG	TTCAGTTGGTT GAATGGGAG	ROX	60	Genotypisierung & Kartierung	manchmal Schattenpeaks; große Fragmente meist schwächer	184	160	220	3
RMS133	GA	nicht nutzbar	TCTGCAACAA CAGCAGAAGA	ATTCTGGCAAA TCCGAATG	FLU	60	Kartierung	unspezifische Amplifikation	124	90	140	4
RMS134	GA	nicht nutzbar	TGAGCTCAAGC AAATGCAA	GGCTGTCCTGA TTCCAGTATG	HEX	60	Kartierung	Z.T. schwache und stotternde Allele	226	150	250	4
RMS135	GA	nicht nutzbar	GACCGATTGGA GAGGAATGA	TTGCCCTTCTC CTCTGTG	ROX	55	Genotypisierung & Kartierung	stark Intensitätsunterschiede zwischen den Allelepeaks	190	160	240	3

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung	Kommentar	erwartete ProduktgröÙe (bp)	GröÙenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel-anzahl pro Sorte
RMS136	GA	nicht nutzbar	GATCATGAGAGT CGCCAAA	AAGAGGGAGATA TGGAGCGA	FLU	55	Kartierung	PCR bei 65°C zu unzuverlässig; bei 55°C unspezifisch	114	90	180
RMS137	GA	brauchbar	TGTACATGATG ATGGGACGC	GGCAAATTGCAAA GACAGTC	HEX	55	Genotypisierung & Kartierung	Stotterbanden & Vorpeaks, meist aber eindeutig auswertbar	228	210	270
RMS138	GA& ande re	gut	CTCTGAGAGC CACACACCA	GCAAACACATCC CATCATCA	ROX	60	Genotypisierung & Kartierung	Schattenpeaks	157	130	180
RMS139	GA	gut	CAAGTATCGCT CAGGCAAGC	CCATCACATTG GCTCTTCT	ROX	65	Genotypisierung & Kartierung	Doppelpeaks, 178 bp-Peak erscheint als Dreifach-Peak	187	170	210
RMS140	GT	gut	CCAATAGCGAT GCAATGAGA	TTGGCTTACCACT AACCTCCC	FLU	60	Genotypisierung & Kartierung	starke Vorpeaks, die aber gut identifizierbar sind; bis auf wenige Ausnahmen monomorph	123	50	140
RMS141	GT	nicht nutzbar	ACAGAGACTTG ACGCTGCAT	AGCGTGTGTAGC TAGGGAGC	HEX	x	keine	keine Amplifikation	202		
RMS142	2 x GA	nicht nutzbar	TGGCCTCAACG TCTTCTACC	CCTGAAATATCC CTATGTCAGAAA	ROX	60	Kartierung	zu viele Fragmente	186	160	290
RMS143	GA	gut	GTTGGAAAGTGT GGGAAACAAAC	GCCCTCATCCTGT CCATCTTC	HEX	65	Genotypisierung & Kartierung	schwache Peaks manchmal nicht eindeutig auswertbar	230	220	250
RMS144	GT	gut	TTTATCACTGT ACAAGGCATT A	GAGCTCCATGAG GTGTTTCC	HEX	60	Genotypisierung & Kartierung	von schlechterer Amplifikation ist das 199 bp-Allel stärker betroffen als das 205 bp-Allel	202	180	210
RMS145	2 x	gut	TGCTCACTTAC	TCTCTCTCATTT	FLU	65	Geno-	wenig polymorph, Allele	122	100	140

Tabelle: Beschreibung der Mikrosatellitenmarker

Marker-name	Motiv	Bewertung	Primer 1 (F), 5' -> 3'	Primer 2 (R), 5' -> 3'	Markierung	Temperatur-optimum	Anwendung & Kartierung	Kommentar	erwartete Produktgröße (bp)	Größenbereich, untere Grenze	Größenbereich, obere Grenze	durchschnittliche Allel-anzahl pro Sorte
GA		CCAGAAGGCC		AAGAGTAAACCC			typisierung & Kartierung	ungleich stark				
RMS146	GT	gut	ACAAAGGCATTC ACCTGGTT	TTTCCTGGGCCTG CATAAATA	ROX	55	Genotypisierung & Kartierung	gut reproduzierbare Peaks, manchmal zusätzliche Stotterbanden im Bereich 160-175 bp, große Allele meist schwächer	186	150	210	3
RMS147	AT& GT	brauchbar	CCAATCTCAAT AACCCGAGC	TCTTTGTGCTGC TAATGCTCA	ROX	55	Genotypisierung & Kartierung	1 bp-Unterschiede im hinteren Bereich kaum auswertbar, insbesondere bei Heterozygoten	191	140	220	3
RMS148	GT	gut	TTAGGCAGGCA TTGGCACTAT	ACCTCCAGCACC AACTCCCT	HEX	65	Genotypisierung & Kartierung	einige schwache Peaks >240 bp nicht ausgewertet	230	210	250	2
RMS149	AT& GT& AT	nicht nutzbar	CGGTGTGTAGT tGATTGGAA	TCAAATTCTGGC CTCTGTCC	HEX	x	keine	keine Amplifikation	203			
RMS150	GT	nicht nutzbar	TGCTGCAGTAt GatGCCAAT	TGAAATCCTTT CCTTCCCTT	HEX	x	keine	keine Amplifikation	209			

**Legenden zu den Abbildungen:**

Abbildung 1 (zweiseitig, a und b): Elektropherogramm der PCR-Produkte der Rosensorten 10 bis 18 mit der Primerkombination RMS059. Peaks bezeichnen Allele, deren Größe automatisch berechnet (untere Zahl unter dem Peak) und einer Allelkategorie zugeordnet wurde (obere Zahl).

Abbildung 2: Verwandtschaftsanalyse der 32 Sorten anhand von 41 Mikrosatellitenmarkern der Kategorie "gut". Je weiter eine Verzweigung zwischen zwei Sorten nach rechts verschoben ist, desto näher sind sie verwandt.

Abbildung 3: Verwandtschaftsanalyse der 32 Sorten anhand von 84 Mikrosatellitenmarkern der Kategorie "gut" und "brauchbar"

## Ansprüche

1. Oligonukleotide von Mikrosatellitenmarkern des Rosengenoms gekennzeichnet durch folgende Sequenzen:

Name	RMS Primer F* 5'->3'	RMS Primer R 5'->3'	Motiv
RMS00 1	TTCAAAATTGCTGCCCTTAG	TACCAGTTGAGTGAGAAATAGTT	GT&G C
RMS00 2	AATAATTTCCTTTGGTA	GATTGTTTCACTATTCA	GA
RMS00 3	TGGGAAAGGGAAAGCAACA	AAGGTAGGCAGAAGTGACAGACA	GA
RMS00 4	CAGGCCAAGGAAGAGGTAAGTAA	CGTATGCGCGTAGGAAGG	GT&A T
RMS00 5	A	ATTTGCCCTCTCCCTTGT	GA
RMS00 6	CTACCGGTGACCAGTGACGA	GTAGGTCGGTCCGTCTGTCA	GT&G A
RMS00 7	ACCGGTCTCATCTTCCATTG	TATGCCATTCAAGACTCTCCAACAC	GA
RMS00 8	TCTCTGCGACAAAAACAAACACT	CCATGAAGCGGCGGAGAGGA	GA
RMS00 9	ATTGGCAAAAGATTCTCCTAC	ACTTGGTAATTCGAGCATAA	CT&G T
RMS01 0	GGTTGGGGAAATTGAAGCAGAG	TCTTTCTTCTACAAACCCCAACCA	GA
RMS01 1	A	AC	
RMS01 2	TAGAAACGACCAATAAAAGAGG	TAACGAAACATCATCAATAGCA	GT
RMS01 3	ATAGAAAAATAGAGGGGGTGTG	GATCGAAAAGTGGTCAAAATA	GT
RMS01 4	GCCTTAGCCGGGTTTCAA	GATCAATACCGAACTAACAAAG	GA
RMS01 5	TATTCTTCTTCCCACCGACGAC	CCTCACTGCCAACCCAACTGT	GA
RMS01 6	TAATGTAGGCAGATATAAAGGAG	GCAGCTGCACAACAAGGAA	GA
RMS01 7	T		
RMS01 8	GGCCTGGACCTTCTCATTG	AACCGCTGCTGCTTCATTTC	GA
RMS01 9	AGGTCCCCTTATTTCAGG	AGTTGGCTTATGGCTTTT	AT&G T
RMS01 0	TTTTGGGTGGTAAGTTT	TTGGCCAATAAGGAAGACA	GT
RMS01 1	ACCGTTCCATTACCCCTTCACC	CGTCGGCCATGGATTTGTA	GA
RMS02 2	AGGCGCCCATGCAAAATCAA	TTCCTAACGCAAACATATGTAAAT	GA
RMS02 3	AATTCCCTCTTACCCAAAACAC	CCGGCGAACATATTGATTGGT	GA
RMS02 4	AAGAAGATAAAATTAGGGGGAAA	GCGCGAACATATTGATTGGT	GA
RMS02 5	AA	TAAACAATATAAATGGGGAGTAA	GT
RMS02 6	TTTGCTATTAATTACAGATGAA	AT	

		41	
RMS02	ACTACTGTAAAATATGAAAAATC	GTAGTAGCGGTTGCAAGAAAATA	AT&G
4	C		T
RMS02	TAATGTAAGCTAACTAATCT	TTTTAAATTTCGGTGGAGA	AT /
5			GT
RMS02	ATAGATATGTTGGGTTCA	AATGTCAGGTTTGTATG	GT
6			
RMS02	ACCGTTGTGCTTATCAGGA	ATTGGTGGTGCTTTACATTAC	AT&G
7			T
RMS02	TAGGCAAGACCATGAACCAG	TGTGCCTGTTGCTTGTGTA	AT&G
8			T
RMS02	GGATAAAACCAACGGGACAGACT	TCCGACACCATCCCTCCTACATAA	GA
9	C		
RMS03	GATAAATTCAAGGCGAGAG	AAAAGATGAACGACCCAAATAAT	GA
0			
RMS03	TATATTAAAGAACAAAGTGAGAAC	GTGGCTATCGAAAAACAA	GA
1			
RMS03	AGAAACCAACCTTAGCAT	AACCATCCATATTCAGTCA	AT&G
2			T
RMS03	CAAGAGATGTCGGAAAAGCAGGA	TGCACACCCAAATTACAAACCAC	GA
3	AGT	A	
RMS03	GCTTCTCGGTCTCGTGCTCTC	CTCCCGCTCAAATCAATAATCTC	GA
4			
RMS03	CCTCCTTGGCAGCCTTTCATT	ATCGGCTATCCACATCGTCTACAC	GA
5			
RMS03	CTCGCGGCCAAATAACAAT	TTGCCCTTACATTTCTACTCCA	GA
6		TA	
RMS03	AACCTCGGAGCCGCATTCAC	AGTTTCCTCGCCAGATAAGC	GA
7			
RMS03	GTGATAAGAGCAAAACAAGATGG	CTCGCGGAAGCCTCAAAA	GA
8			
RMS03	GCTGCTTCTCCAATCAACAA	CAGCTCAGCAAAGGGGACTA	2xGA
9			
RMS04	AACCCCAAACCTCCTAAACT	TCTGTATCTACTGTGGCTAAC	GT
0			
RMS04	TTAACCCAAAGCACCAAAAT	ACCTTCACCGATGTATCACC	GA
1			
RMS04	GCATGGCCAGGCTTTCAC	ATGCCAACGTCTCAGTCAACC	AT&G
2			T
RMS04	GATCAAAGATGGGTTCTCCTCTC	AGGGGAATCTTGAAAGTCGTT	GA
3			
RMS04	ACCGATGGATGGCAATAAC	ATACAGGACATAAACGGCTACC	AT
4			
RMS04	GAAAATAAGGACATCATCTAC	GGTGCCTCCATTATTTAC	AT&G
5			T&AT
RMS04	AAAGGATTGCTGGATGTG	TATTCGCGTGGACTCTAT	&GA
6			AT&G
RMS04	GCTCCCTCAATTCCACTCA	ACCAACCCAATTCGCTCAT	T
7			GA
RMS04	ATAAGTATGAAAAAGTAAAATGA	GTATACTAGAAAAACAAAATGGT	GA&A
8	T		T
RMS04	AAAAATACAACCGAAAAAA	CCAACCCGTCAAGGCTAAA	AT&G
9			T
RMS05	TAAGCCTAAGAAAAACTCATT	CAGCCGTCAGATTCACTTG	AT&G
0			A

		42
RMS05	AGTAGACTGTCCTCCATTAGC	ATACCATCAGAGAAGAGACGACA
1		GT
RMS05	TTAGCCGTTAATTGAGTCGACAA	C
2	CCTC	TGATGAACCCAATAGAATGAAAAC
RMS05	GGCGGTAGCTAGTGACTGGAATC	GA
3	T	AGA
RMS05	CTGGGAGGAGAACTCTGTCA	CCCTTACCCCTTACCCCTTGTAC
4		GA
RMS05	TGATCACAAAGAGCTTTCAAGTT	TAGCTTATTAGTCTGCATTGATGA
5	AG	AT&G
RMS05	TGTGTAGATTAGCATTCC	GATCTAGGATGATTCAATA
6		GA
RMS05	CGAGGTGGTAAGGGCGAACAAA	CCCATCCAAAGCGAGACGACGAC
7	G	GAA /
RMS05	CAACCCCTGAAGCCTGAA	TTTGTAAACCCATTGACCATA
8		GA
RMS05	ACAGTCTTATAGTGGCTTCC	TACAGGGTTCTAATTGATACATAC
9		AT&G
RMS06	CATTCATTTGACTCTAAGGA	TATTCTGGTCTAAGCTATTGTAA
0		T
RMS06	ATATCAGCCGTCCCATTAG	TTAGAAAATCCAAACAT
1		GA
RMS06	GCGAACGGCATTACTTGT	GGTTGTTCTGGGTGGTTTT
2		GA&G
RMS06	CCACCGCCCCACAATCACAATG	GCTCTGCGGAGTGGGAATGGT
3		T
RMS06	TTTTGCAATATGTGAAGC	GATTGGTCAACCGATATGTAGAA
4		GA,
RMS06	TATAGCTCGGTAGATTCAAA	CCAGACTGCCCAACTCATA
5		GT
RMS06	TCCACCCACAGACCACAG	AAGCTCCCTACGATTCACTC
6		GA
RMS06	CAATCTGCAATCCGAATCC	ATGGTGAAAAACAGAAATACTACA
7		GA
RMS06	GTGCGTTCTGCTCCATT	CATTTGTCCTACGTTTCACCTC
8		GA
RMS06	TCGGAGATTAAGAGTGAGGTGAG	GTGCCCACTTACCCAAACCATC
9	T	GT&G
RMS07	TGCCTCTCGATACAAACC	AATAAGAACCAATACCCGAAGA
0		A
RMS07	GTTAGCATCTGGCACATTAT	G
1		GA
RMS07	TTAGCTCAAGAATTCAAAAG	AGTTCCCTGACCAGCAGAG
2		GT
RMS07	AAACCCTTTATGTAGAAGTAG	TCCAAACCGAGCTAAGAAAAC
3		GA
RMS07	GCTTCTATCCACAGTTCACCTC	TAAAACATGAAATTATAACAATAG
4		AT&G
RMS07	GCCCGTAAAAGCCCGTAAA	TG
5		T/GAA
RMS07	TGGATGCAAACACCTACAAA	TTCATGTCAACGCTTGTAAATAG
6		AT&G
RMS07	AGGTGAACATGGGCCAACTA	T
7		T
RMS07	CCATTCAAAGTTGCACGTA	TCAAAGAACATGAGTGCCTACTAAGA
		GA&G
		T
		GT

8		
RMS07	CCGGTATGGAGAGGAATGAG	GCAATTATCCTTGACAGAACCC
9		GA
RMS08	GCTTCAAAGATGGAAACCT	TTGGTATCACATTAACCTCATTGC
0		GT
RMS08	TTGACACACACACACAAACAT	GAATGAGAAACAAGTCCGTCC
1		GT&G
RMS08	AACAAACACACGCGGAATATG	TGCAGTTGGAGTTGGAGTTG
2		2xGA
RMS08	GACGTCCGCACTTAGCAAC	AGGTCCCTCAGCATAGACGGC
3		GT
RMS08	GGGAGTCTCAAGAGCTACCGT	CTTCATGTAAGCCACTGGACA
4		GT
RMS08	ATGCCCATGACTATCTTGCC	TCCAAGATGAAGAATTGCGG
5		GA
RMS08	TTCTGTTCATCTGGCCTCC	GTTCGTAGATTCAAGGTCGGC
6		GA
RMS08	GCCCAACTATTCCCTCCACT	CCCACAGTTGCCAACACAA
7		GA
RMS08	TCCTGATTCGTATCATCCACTG	GAAGGCCTCAAGGTTCCCTCT
8		GA
RMS08	TTCTTATTGTTGGTTGGAAGAAA	TCAATAGTGAGGTGCGAGGA
9		AT&G
RMS09	TGTGTGTATCCATGGCCT	ATCTGCAATGACAATGGCAA
0		T
RMS09	GATCAGGGTGAATACCGAGC	GCCACTCTCTCTGTCCTCAA
1		GT&G
RMS09	TGAAATGAGAGACCAATTCCAA	ATCAAGTGAGCCGATGGAG
2		T
RMS09	CGTTCTCGTTGTTGTCATCG	CCCTCTCTCCAGTCACGA
3		GA
RMS09	TCCTATCCACACCGACATCA	TCACAAATACCTCCACTCGC
4		GA
RMS09	CCAATCTCCTCAACTCCAG	TCAGGGCTTCTAAAGCTTGC
5		GA
RMS09	TGACCAATATGACAGAGAACCAA	TGATAGCCTTACATATGGAAACAT
6		AT&G
RMS09	ATCTGGCTGAACACCCACACA	T
7		T&AT
RMS09	CACGTCCCATTCCAGAATT	CATGCTAACTCTCCATGTTCCA
8		GA&G
RMS09	GGTCTGGTTCTTGAGGTGA	CCCTCAATGGAGAGCAAGAG
9		T
RMS10	AGAGCTCCGCTCTGGATATG	GT /
0		GA
RMS10	GAAGAGACTGAAAGCTTGAAGGA	CTCTCTCCACTCCTCACCA
1		GA
RMS10	AACTAAATGGTTGAGATGCCAA	GGAATTCTGTTCTTAAGCTAAGTT
2		GT
RMS10	ATTATGCGAACCAAACGAGG	TGGCAGCATTCTCCCTAAAC
3		GT
RMS10	CTAAAGCTTGAGCAAACAAATG	GGAGTATTGGCCGTAGGTGA
4		GA
RMS10	TTGGTCTAATGCCCTATCCC	CCAGCCCTAGCCATAATTGA
5		GT&A
		T

	44	
RMS10	CTCTCCCTCTGCATCAAA	CCTCTCTCTGCAACCCAAG
6		GA
RMS10	CGACCTTGAACTCGATGGAT	CATGAAAGTGGAGCTAGCTAAGAA
7		AT&G
RMS10	GATGCCATGGCATGTAAAG	TTCTTCTAGTTCCGGCTGC
8		GA
RMS10	TGCAAACCTAAATTCCACAGAA	TGGCCTCTACAGCTCCTGTT
9		GT
RMS11	TATGAGAATGAGCGTGTGGG	TTCCCTCTCATTCCTCTCCC
0		GT
RMS11	TTAGTCATCATCTTCAGTTATCAA	ATTCAATTGGCTTCACTGGG
1	GAA	GA
RMS11	CAAGGATACCAGTCGGAGAGA	AGAAATGGACAGCTCCGAAA
2		AT&G
RMS11	CATGGATTGCGTGTCTTCTG	GGCATCAGAAAGCTGAAAGG
3		GA
RMS11	AGTCGCATAACAGGACTGGG	TTGGGATTCGGATAAGTCG
4		GA
RMS11	CGTGAAGACGCAAAGTCAA	GGAGGAGAAGGAGGATTGTG
5		GA
RMS11	CACCCACTGGAATACTGGCT	CGACAAGCATGACCTGAAAT
6		AT&G
RMS11	TCTTCTTCTCTCACCGCCAT	GGCCGATTGTTGACCTAGA
7		GA
RMS11	TGGCTATGGGAAGAACATGA	TCAGACAAATAATGCGTTACCAA
8		(AT&) GT
RMS11	GCACGCACACATATATAACAACA	GATATCCGCAGCCAAGAAAG
9	A	AT&G
RMS12	CAGTTGAAGAGAACCAAGGG	TGGTGGGTAGGGAAATGAAA
0		GT
RMS12	TCCTCTCCAAGACACAATATTCAA	GCCCTCTCTGCTCTCCCTAA
1		GT
RMS12	ATTCCACTCCTCCTTCCCA	GGATTCTTCCTCCTGACCC
2		GA
RMS12	AAACACTCTAAGGAGGTATTCCC	CGAAGTCTCCATGGTTCT
3	TAA	GA
RMS12	TTTGTGGTCGTGTGTGTAT	AGGCACAAATACTATCCACCTG
4		GT
RMS12	AAAGTGAAGACTGAGCGACCG	CTACTCCAATGTCCGCTTCC
5		GA
RMS12	AACGACCGCCTAGGAGAAA	TTGTTCTGTTCGAATGGGT
6		GT
RMS12	TGCCTTCTAGATTGCTGGA	TAGTTGTTCGTCACCCACCC
7		GA
RMS12	AGCATCACGAGCACATTCA	GCGAAGATTCACCCAATGAC
8		GA
RMS12	ACGTGCACACACTCACACAC	ACTGATGCAGTTGCTCTGA
9		GT
RMS13	CAAATCAATCTGCAAACCCA	TTTGCAGATACCAGATGCAG
0		GA
RMS13	CGGCCAGAGATAACAGATGG	TGTTTGTGCTTAACTACTACAACC
1	TT	GA
RMS13	TGTGGTTATGAATTGCTGGTG	TTCAGTTGGTTGAATGGGAG
2		GA
RMS13	TCTGCAACAATCAGCAGAAGA	ATTCTGGCAAATCCGAATG
		GA

3		
RMS13	TGAGCTCAAGCAATATGCAA	GGCTGTCTCTGATTCCAGTATG
4		GA
RMS13	GACCGATTGGAGAGGAATGA	TTGCCTTCTCCCTCTGTT
5		GA
RMS13	GATCATGAGAGTCGCCAAA	AAGAGGCAGATATGGAGCGA
6		GA
RMS13	TGTACATGATGATGGGACGC	GGCAATTGCAAAGACAGTCA
7		GA
RMS13	CTTCTGAGAGGCCACACACCA	GCAAACACATCCCATCATCA
8		GA&a ndere
RMS13	CAAGTATCTGCTCAGGCAAGC	CCATCACATTGGCTCTTCT
9		GA
RMS14	CCAATAGCGATGCAATGAGA	TTGGCTACCACTAACCTCCC
0		GT
RMS14	ACAGAGACTTGACGCTGCAT	AGCGTGTGTAGCTAGGGAGC
1		GT
RMS14	TGGCCTCAACGTCTTCTACC	CCTGAAATATCCCTATGTCAGAAA
2		2 x GA
RMS14	GTGGGAAGTGTGGGAACAAAC	GCCTCATCCTGTCCATCTTC
3		GA
RMS14	TTTATCACTGTCACAAGGCATTA	GAGCTCCATGAGGTGTTCC
4		GT
RMS14	TGCTCACTTACCCAGAAGCC	TCTCTCTCATTCAAGAGTAAACCC
5		2 x GA
RMS14	ACAAGGCATTCACCTTGGTT	TTTCTGGCCTGCATAAATA
6		GT
RMS14	CCAATCTCAATAACACCGAGC	TCTTGTGCTGCTAATGCTCA
7		AT&G T
RMS14	TTTAGCAGGCATTGGCACTAT	ACCTCCAGCACCAACTCCT
8		GT
RMS14	CGGTGTGTAGTTGATTCGGA	TCAAATTCTGGCCTCTGTCC
9		AT&G T&AT
RMS15	TGCTGCAGTATGATGCCAAT	TGGAAATCCTTCCTTCCTT
0		GT

2. Testkit zur genetischen Analyse von Kultur- und Wildformen der Gattung Rosa umfassend ein oder mehrere Oligonukleotidpaare nach Anspruch 1.
3. Testkit nach Anspruch 2 umfassend mindestens ein Oligonukleotidpaar folgender Mikrosatellitenmarker: RMS001 RMS003 RMS008 RMS011 RMS015 RMS017 RMS024 RMS030 RMS034 RMS035 RMS039 RMS042 RMS043 RMS044 RMS045 RMS046 RMS050 RMS051 RMS054 RMS055 RMS060 RMS061 RMS071 RMS073 RMS078 RMS079 RMS080 RMS082 RMS086 RMS091 RMS094 RMS108 RMS110 RMS116 RMS117 RMS118 RMS122 RMS125 RMS126 RMS129 RMS132 RMS137 RMS147 RMS023 RMS027 RMS029 RMS037 RMS038 RMS047 RMS052 RMS057 RMS058 RMS059 RMS062 RMS063 RMS065 RMS066 RMS070 RMS072 RMS077 RMS084

RMS059 RMS062 RMS063 RMS065 RMS066 RMS070 RMS072 RMS077  
RMS084 RMS088 RMS089 RMS090 RMS095 RMS097 RMS098 RMS102 RMS103  
RMS104 RMS107 RMS112 RMS113 RMS115 RMS120 RMS128 RMS138 RMS139  
RMS140 RMS143 RMS144 RMS145 RMS146 RMS148.

4. Testkit nach Anspruch 2 umfassend mindestens ein Oligonukleotidpaar folgender Mikrosatellitenmarker: RMS023 RMS027 RMS029 RMS037 RMS038 RMS047 RMS052 RMS057 RMS058 RMS059 RMS062 RMS063 RMS065 RMS066 RMS070 RMS072 RMS077 RMS084 RMS088 RMS089 RMS090 RMS095 RMS097 RMS098 RMS102 RMS103 RMS104 RMS107 RMS112 RMS113 RMS115 RMS120 RMS128 RMS138 RMS139 RMS140 RMS143 RMS144 RMS145 RMS146 RMS148
5. Testkit nach Anspruch 2 umfassend mindestens ein Oligonukleotidpaar aus folgendem Set: RMS023, RMS029, RMS038, RMS047, RMS052, RMS057, RMS059, RMS062, RMS065, RMS070, RMS077, RMS088, RMS089, RMS095, RMS097, RMS102, RMS103, RMS104, RMS112, RMS115, RMS120, RMS128, RMS139, RMS146 oder RMS148.
6. Testkit nach Anspruch 2 oder 3 umfassend folgende Oligonukleotidpaare: RMS023, RMS029, RMS038, RMS047, RMS052, RMS057, RMS059, RMS062, RMS065, RMS070, RMS077, RMS088, RMS089, RMS095, RMS097, RMS102, RMS103, RMS104, RMS112, RMS115, RMS120, RMS128, RMS139, RMS146 oder RMS148.
7. Verfahren zur Herstellung von Mikrosatellitenmarkern für Pflanzen der Gattung Rosa, dadurch gekennzeichnet, dass hypervariable Genomabschnitte (sogenannte Mikrosatelliten) mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) zu polymorphen Fragmenten in Gegenwart mindestens eines Oligonukleotidpaars gemäß Anspruch 1, das links und rechts für jeden Mikrosatelliten-Locus eine Mikrosatellitensequenz flankiert, amplifiziert, anschließend aufgetrennt und detektiert werden.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Auf trennung der Mikrosatellitenmarker gelelektrophoretisch, insbesondere durch hochauflösende Agarosegele, native Polyacrylamidgele, denaturierende Polyacrylamidgele oder massenspektrometrisch erfolgt.
9. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion je nach Trennungssystem über Ethidiumbromidfärbung, Silberfärbung, bei radioaktiver Markierung über Autoradiographie oder mittels automatischem Sequenziergerät unter Verwendung farbstoff- bzw. fluoreszenzmarkierter Primer oder massenspektrometrisch erfolgt.

10. Verwendung der Oligonukleotide nach Anspruch 1 zur genetischen Analyse von Kultur- und Wildformen der Gattung Rosa.
11. Verwendung nach dem Anspruch 10 zur genetischen Kartierung und Markierung von monogenen und polygenen Eigenschaften und deren Selektion, zur Verwandtschaftsanalyse und Sortenidentifikation sowie zur Evaluierung von Sortenreinheit, Hybrididentifikation und Pflanzenzüchtung.

1 / 4

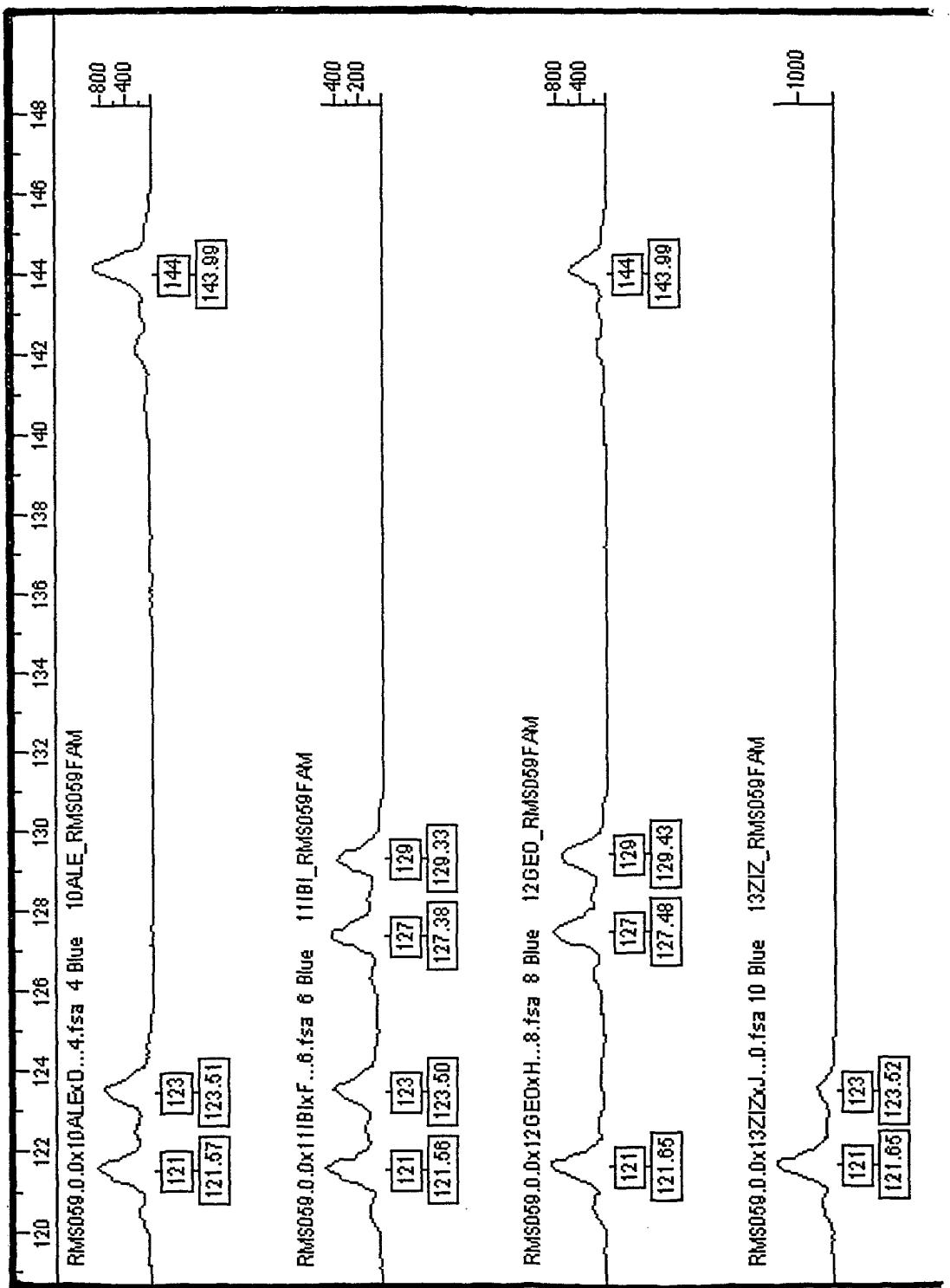


Abbildung 1a

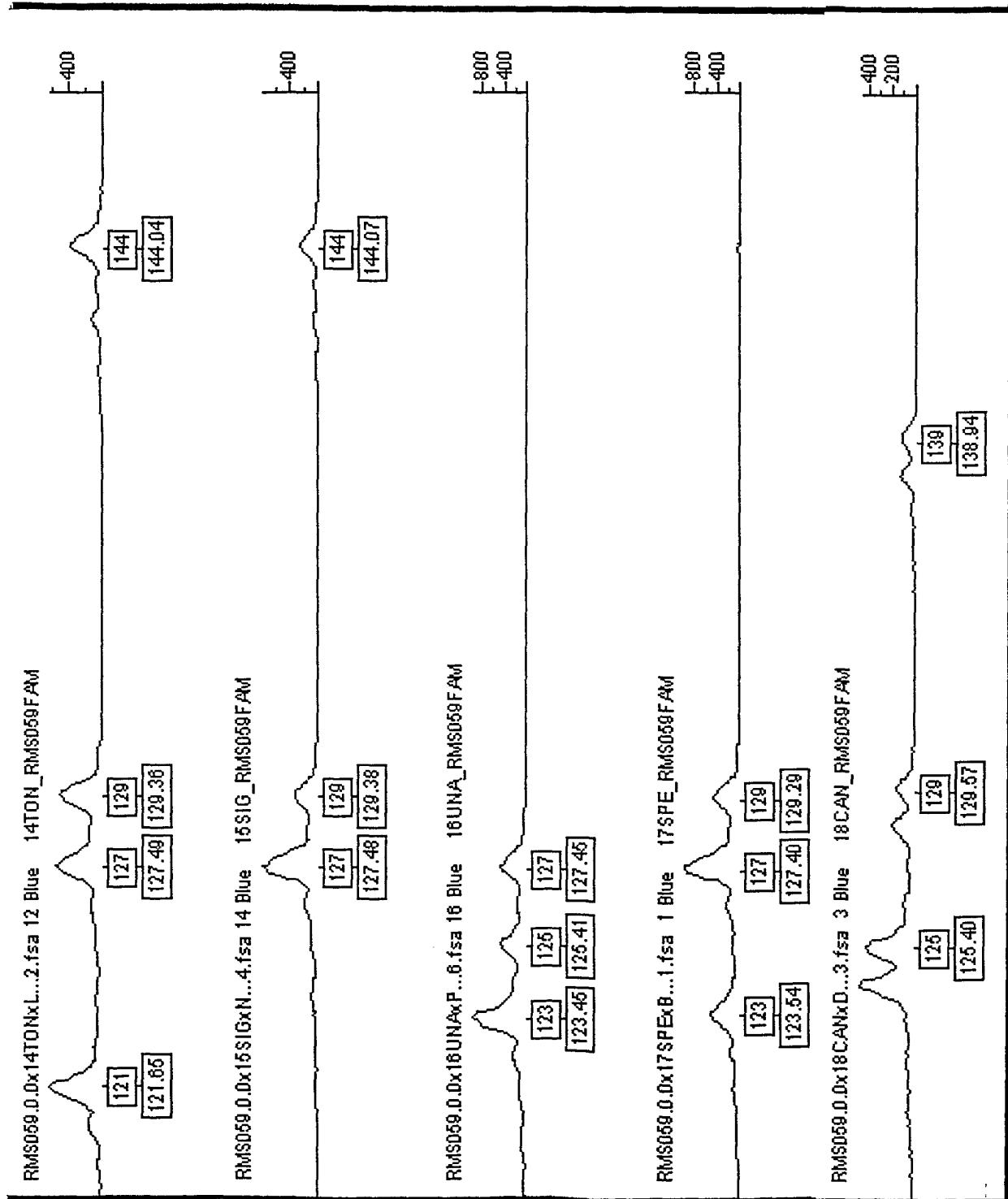


Abbildung 1b

Abbildung 2:

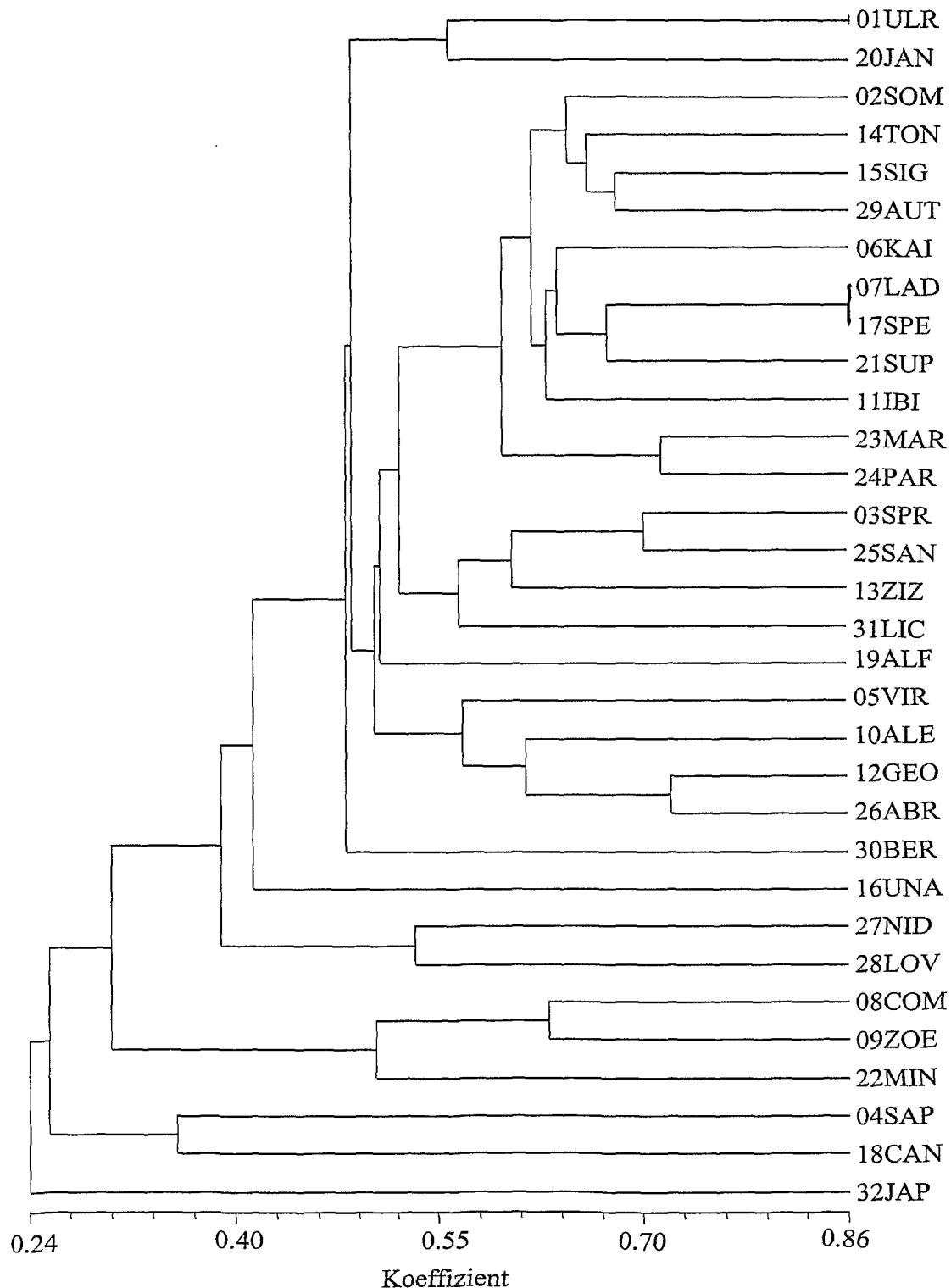


Abbildung 3:

